

Jochen Duelli

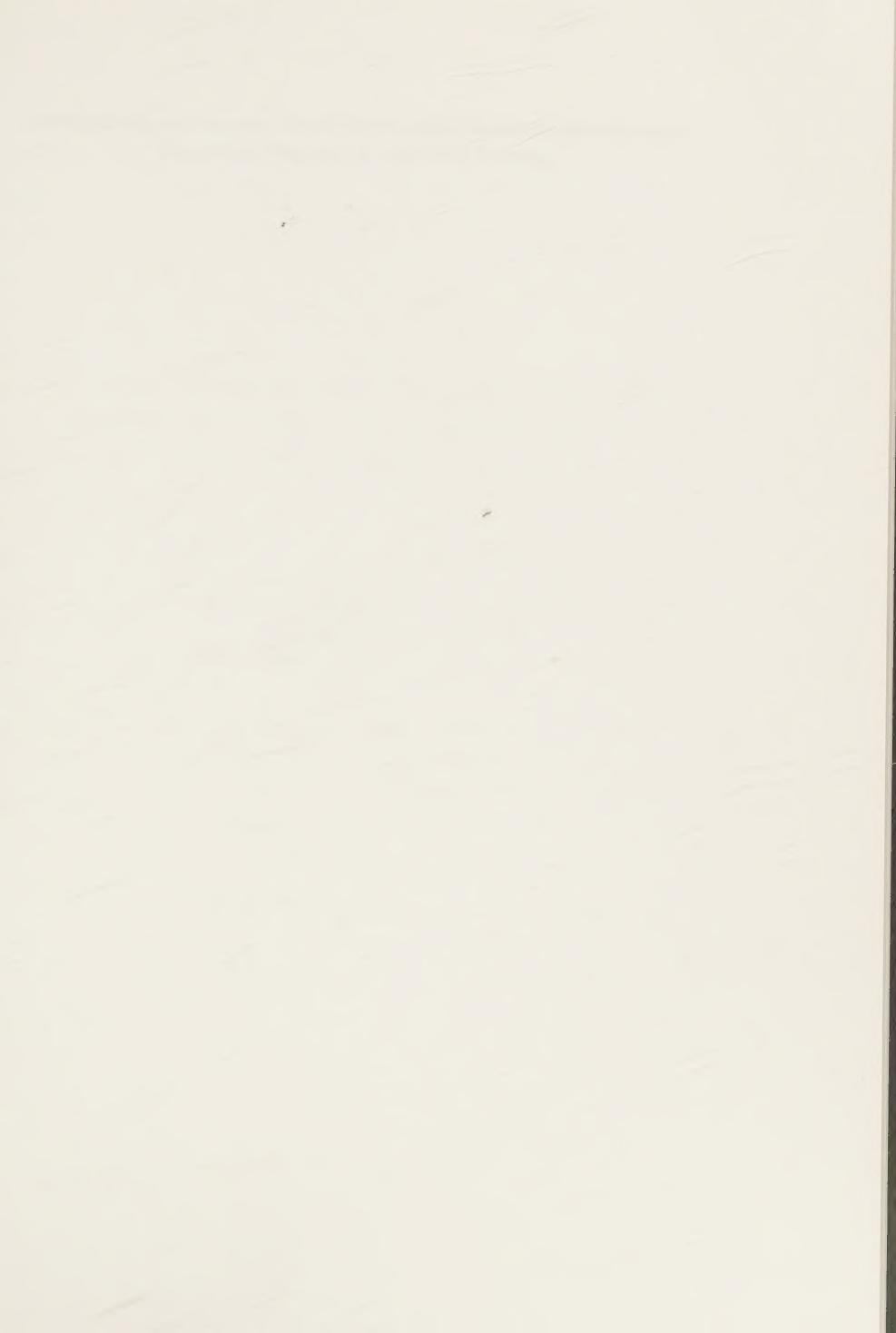
**Untersuchung von Cis- und
Trans-Effekten einer klonierten,
chromosomal integrierten
Hepatitis B Virus DNA Sequenz**

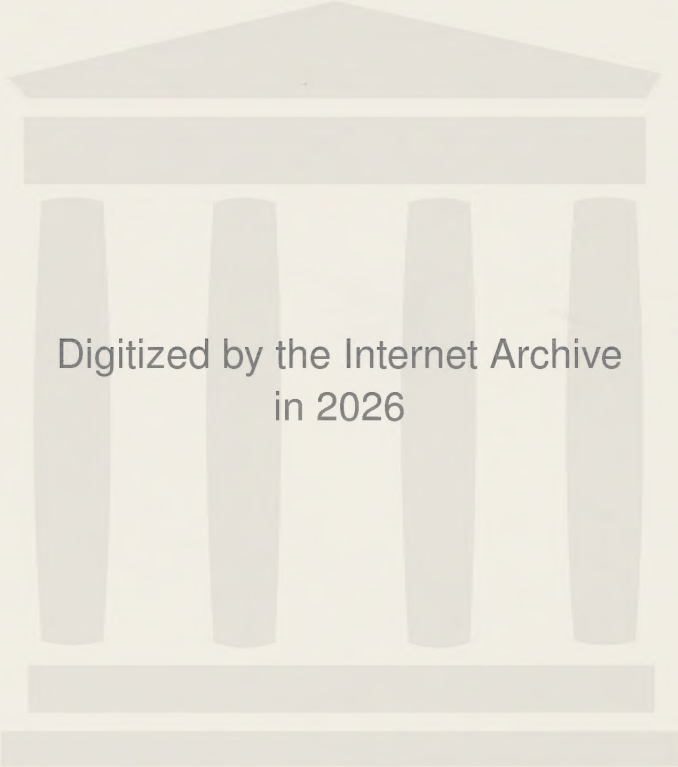
Hannes Gertner Verlag München

Disbui. München

1988







Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchung von Cis- und Trans-Effekten einer klonierten, chromosomal integrierten Hepatitis B Virus DNA Sequenz

Vorliegende Untersuchung wurde im Jahr 1988
von der Humanbiologischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
als Dissertation angenommen

ISBN 3-925632-03-4

Copyp.: Hannes Gertner Verlag München
Alle Rechte vorbehalten
Nachdruck und Vervielfältigung
nur mit Genehmigung des Verlages

Satz: Fa. Bischoff, 8 München 5

Druck: Altstadt Schnelldruck, 8540 Schwabach

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
Abt. Virusforschung
Vorstand Prof.Dr.Dr. P.H. Hofschneider

Untersuchung von Cis- und Trans-Effekten einer klonierten, chromosomal integrierten Hepatitis B Virus DNA Sequenz

Inaugural-Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Jochen Duelli
aus
Freiburg
München, 1988

Mit Genehmigung der Fakultät für Biologie
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof.Dr. H. Schmieger

2. Berichterstatter: Prof.Dr. H. Cleve

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. R. Kosky

Dekan: Prof.Dr. A. Böck

Tag der mündl. Prüfung: 8.3.1988

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A ZUSAMMENFASSUNG	1
B EINLEITUNG	4
1. Aufbau der Hepatitis B Virus (HBV) Partikel	4
2. Genomische Organisation des HBV	5
2.1 Transkriptionselemente	10
2.2 Genprodukte	12
3. Animale Hepadnaviren	14
4. Replikation	15
5. Biologische und klinische Aspekte der HBV Infektion	16
6. HBV Infektion und Primäres Leberzellkarzinom (PLC)	20
7. Struktur integrierter HBV DNA in Tumoren	21
8. Modelle der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese	22
8.1 Direkte HBV-spezifische Onkogenwirkung	23
8.2 "cis"-Mechanismen	24
8.3 "trans"-Mechanismen	25
8.4 Multifaktorielle Mechanismen	26
C PROBLEMSTELLUNG	28
D MATERIAL UND METHODEN	30
1. Material	30
1.1 Chemikalien	30
1.2 Enzyme	31
1.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Mäuse	31
1.4 Medien und Puffer	32
1.5 Plasmide	34

	Seite
2. Methoden	36
2.1 DNA Isolation	36
2.1.1 Isolierung chromosomaler DNA	36
2.1.2 Schnellpräparation von Cosmid- und Plasmid-DNA	36
2.1.3 Präparative Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA	37
2.2 Restriktion von DNA	38
2.3 Dephosphorylierung	38
2.4 Agarosegel-Elektrophorese	39
2.5 Elektroelution von DNA Fragmenten	40
2.6 Klonierung in Cosmiden	40
2.6.1 Partialverdau genomischer DNA und Größenfraktionierung	40
2.6.2 Ligation	41
2.6.3 Herstellung von Verpackungsextrakten	41
2.6.4 In vitro Verpackung und Plattierung	42
2.7 Subklonierung in Plasmiden	43
2.7.1 Ligation	43
2.7.2 Transformation von E.coli	43
2.8 DNA Transfer auf Nitrozellulosefilter	44
2.8.1 Kolonieblot	44
2.8.2 Slot Blot	45
2.8.3 Southern Blot	45
2.9 Nicktranslation	46
2.10 DNA-DNA Hybridisierung	47
2.11 Plasmid DNA Sequenzierung	48
2.12 Computerprogramme	53
2.13 Zellkultur	53
2.14 Transfektion eukaryontischer Zellen	53
2.15 Radioimmunassay für HBsAg und HBeAg	54
2.16 CAT Aktivitätstest	55
2.17 Inokulation von Mäusen	56

III

	Seite
3.6.2 Transaktivierung durch die Subfragmente a und b	119
3.6.3 Die transaktivierende Funktion in unterschiedlichen Zelllinien	121
3.7 Zwischenzusammenfassung	124
F DISKUSSION	125
1. Struktur des HBV DNA Integrats	125
2. Integrationslocus der viralen DNA	127
3. Biologische Aktivität der integrierten HBV DNA Sequenz	129
3.1 Expression viraler Gene	129
3.2 cis-Effekte der HBV DNA	130
3.3 trans-Effekte der viralen DNA	132
3.3.1 Mögliche Mechanismen der Trans- aktivierung und Tumorgenese	134
G LITERATUR	140
H ABKÜRZUNGEN	163
I DANKSAGUNG	164
J LEBENSLAUF	165

A. ZUSAMMENFASSUNG

Der ätiologische Zusammenhang zwischen der persistierenden Hepatitis B Virus (HBV) Infektion und der Entstehung des primären Leberzellkarzinoms (PLC) beim Menschen gilt aufgrund epidemiologischer Untersuchungen als sehr wahrscheinlich. In vielen dieser Tumore ist HBV DNA chromosomal integriert.

Die Rolle des HBV bei der Entwicklung des PLC ist auf molekularer Ebene noch nicht geklärt. Da HBV kein eigenes Onkogen besitzt, kommen deshalb mehrere Hypothesen, wie cis-/trans- Mechanismen, zur Erklärung einer HBV assoziierten Onkogenese in Frage. Ein genereller cis-Mechanismus konnte bisher nicht bestätigt werden, da man weder eine spezifische Integration von HBV DNA in bestimmte Chromosomen noch in spezifische Regionen definierter zellulärer Gene gefunden hat. Hingegen könnte eine direkte oder indirekte Transaktivierung zellulärer Gene durch ein virales Protein zur malignen Transformation von Hepatozyten beitragen.

Um cis-Effekte von HBV auf die mittelbare Nachbarschaft zu untersuchen, wurde das singuläre HBV DNA Integrat aus der humanen Hepatom-Zelllinie huH-4 zusammen mit großen Abschnitten 5'- und 3'- flankierender humaner DNA im Cosmidssystem kloniert. Die zwei isolierten Klone huH-4/3 (42 kb) und huH-4/9 (45 kb) sind, wie durch Restriktionskartierung gezeigt werden konnte, überlappend. Die genaue Struktur des HBV DNA Integrates wurde durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung bestimmt. Interessanterweise besteht dieses 5,4 kb große Insert aus mehr als einer HBV Genomlänge. Die virale DNA ist, bis auf eine Inversion am einen Ende, kolinear

mit dem publizierten HBV Subtyp adr. Die HBs, HBc und HBx Gene sind strukturell intakt. Nach Transfektion der Cosmidklone in LTK, NIH 3T3 und Fisher rat Fibroblasten konnte das virale Oberflächenantigen (HBsAg) nachgewiesen werden. Das HBc Gen wird nicht exprimiert.

Die Nukleotidsequenzierung von einem der beiden viralen/zellulären Übergänge zeigte, daß die Integration des HBV in eine Region, die homolog zum Intron 4 der schweren Kette des IgG Genes ist, stattfand.

In beiden Cosmidklonen konnten keine onkogenen Eigenschaften nachgewiesen werden, da sie:

- 1) keine Sequenzen von neunzehn (von heute etwa 35) bekannten Onkogenen enthalten;
- 2) weder NIH 3T3 noch Fisher rat Zellen transformieren;
- 3) nach Kotransfektion mit einem G418 Marker Plasmid in NIH 3T3 Zellen, nachfolgender G418 Selektion und anschließender subkutaner Inokulation der selektierten Klone in nu/nu Mäuse keine Tumore erzeugen.

Da keine cis-Einflüsse der HBV DNA auf benachbarte Proto-onkogen DNA Sequenzen nachgewiesen werden konnten, wurde versucht, eine transaktivierende Funktion des HBV Inserts aufzufinden. Im Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) Aktivitätstest konnte eine transiente Stimulation der CAT Genexpression eines Plasmids, in dem das CAT Gen vom SV40 early Promoter kontrolliert wird, nach Kotransfektion mit verschiedenen Subklonen des HBV DNA Integrates nachgewiesen werden. Mit abnehmender phylogenetischer Verwandtschaft der transfizierten Zelllinien mit humanen Hepatomzellen (CCL 13, HeLa, Vero, NIH 3T3) wurde abnehmende Transaktivität gefunden.

Der Transaktivierungseffekt konnte außerdem in fünf weiteren klonierten HBV DNA Integraten aus unserer Ar-

Der Transaktivierungseffekt konnte außerdem in fünf weiteren klonierten HBV DNA Integraten aus unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden und scheint generell in integrierten HBV DNA Sequenzen konserviert zu sein.

B. EINLEITUNG

Obwohl Hepatitis als infektiöse Erkrankung schon im Altertum bekannt war, gelang es erst in den späten 60er Jahren das Hepatitis B Virus (HBV) als deren häufigste Ursache zu identifizieren. Von medizinischem Interesse ist jedoch nicht nur die HBV Infektion an sich, sondern besonders eine mit der Persistenz des HBV häufig einhergehende Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms. In den 70er Jahren wurden die strukturellen und biologischen Eigenschaften von HBV analysiert, wobei Untersuchungen über die virale Replikation durch den engen Wirtsbereich und des Fehlens eines in vitro Systems zur Virusvermehrung erschwert wurden. Fortschritte auf dem Gebiet der HBV Forschung wurden innerhalb der letzten Dekade vor allem durch die Gentechnologie und durch die Entwicklung von Tiermodellen erzielt.

1. Aufbau der Hepatitis B Virus (HBV) Partikel

Aus dem Serum von Hepatitis B Patienten konnten drei Typen von Partikeln isoliert werden: das 43 nm große kugelförmige, infektiöse Virion (Dane Partikel) sowie die in 10^3 bis 10^6 fachem Überschuß vorkommenden filamentösen und kugelförmigen Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm.

Alle Partikel tragen das Hepatitis B "surface" Antigen (HBsAg) auf ihrer Oberfläche. Dieses Protein präsentiert die Gruppenderminante a und zwei Gruppen von Subtyp Determinanten mit gegenseitiger Exklusion (d oder y und w oder r). Die drei Serotypen adw, adr und ayw sind am häufigsten verbreitet, wobei jedoch y und r Determinanten in Afrika und Ostasien offensichtlich

nicht vorkommen (Courouce-Pauty, 1983). Zwischen den Serotypen besteht Kreuzimmunität.

Die filamentösen und kugelförmigen 20 nm Partikel bestehen lediglich aus HBsAg und damit assoziierten Lipiden humanen Ursprungs. Obwohl diese subviralen Lipoprotein-Partikel keine Nukleinsäure enthalten und daher nicht infektiös sind, werden sie bei der Infektion in hoher Menge produziert (50-300 µg/ml Serum). Die Gründe für dieses Phänomen sind bis jetzt nicht geklärt; diese Partikel könnten dazu dienen, während einer frühen Phase der Infektion gebildete, neutralisierende anti-HBsAg Antikörper zu adsorbieren (Ganem, 1987; Übersichtsartikel).

Dane Partikel bestehen hingegen aus einer Hülle und einem, das virale Genom enthaltenden, Nukleokapsid (core; Durchmesser: 27 nm; Landers, 1977). Die Virushülle enthält neben HBsAg (Tiollais, 1985; Übersichtsartikel) auch Kohlenhydrate, Proteine und Lipide zellulären Ursprungs (Heermann, 1984). Die Hülle des Nukleokapsids besteht hauptsächlich aus dem Hepatitis B "core" Antigen (HBcAg). Im Inneren des cores befindet sich die zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA sowie ein an die virale DNA gebundenes Protein (Gerlich, 1980), eine spezifische DNA Polymerase (Hess, 1981) und eine Proteinkinase die das HBcAg phosphorylieren kann (Albin, 1980; Gerlich, 1982).

2. Genomische Organisation des HBV

Das HBV Genom besteht aus einem nur 3,2 kb großen zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA Molekül (Abb. 1). Das somit kleinste, bekannte DNA Virus besitzt eine Struktur, die es von allen anderen Viren unterscheidet.

Der lange (L) oder minus (-) DNA Strang hat Einheitslänge, wobei das Phosphodiestergerüst an einer definierten Stelle ("nick") unterbrochen ist. Dieser Strang trägt am 5'-Ende ein kovalent gebundenes Protein unbekannten Molekulargewichts (Gerlich, 1980). Der komplementäre Strang variiert, sogar zwischen Molekülen eines Subtyps, zwischen 20 und 80% der Einheitslänge, wobei das 5'-Ende fixiert ist (Will, 1987). Er wird als kurzer (S) oder plus (+) Strang bezeichnet. Der einzelstängige DNA Bereich wird "gap" genannt. Die zirkuläre Genomstruktur wird durch Basenpaarung der 5'-Enden beider Stränge aufrechterhalten (Delius, 1983). In der Nähe der 5'-Enden dieser Stränge befinden sich zwei 11 bp Sequenzrepetitionen ("direct repeats", DR), die bei der Replikation eine wichtige Rolle spielen.

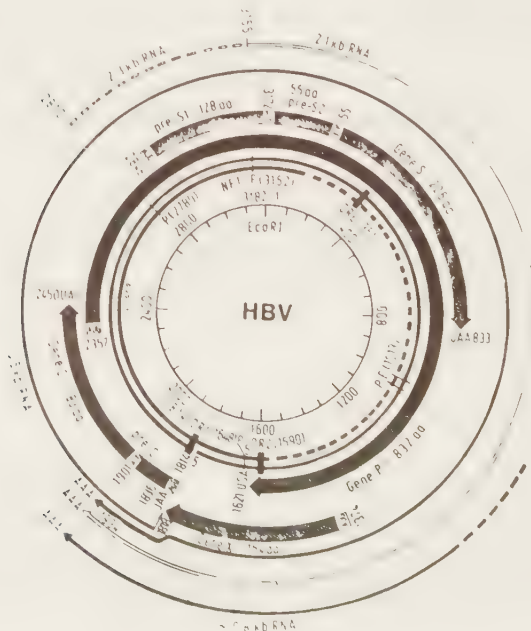


Abb. 1: Genkarte des Hepatitis B Virus

Im Virion (Dane Partikel) liegt das Genom des HBV als zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA vor. Dies ist durch die fett gezeichneten Linien schematisch dargestellt, wobei die variable Ausdehnung des einzelsträngigen Bereichs des (+) Strangs ("gap" Region) gestrichelt gezeichnet ist. Der innere Kreis ist in bp unterteilt; die einzige EcoRI Schnittstelle wurde als Position O definiert. Die Positionen der "direct repeats" (DR1, DR2), der Bindungsstelle des nukleären Faktors I (NFI), der Glucocorticoid-Rezeptorsequenz (GRE), der bisher bekannten Promotoren (P; die genaue Position des HBx Promoters ist noch nicht lokalisiert), des Enhancers (E) und des Polyadenylierungssignals (AAA) sind gekennzeichnet. Die fett gezeichneten Pfeile repräsentieren die ORFs S und preS, C und preC, P und X; die Positionen der Start- und Stop-Kodons sowie die Länge (Anzahl der Aminosäuren, aa) der entsprechenden Proteine sind angezeigt. Die äußeren Pfeile symbolisieren die Transkripte des HBV: die HBsAg Proteine werden von den 2,3 kb und 2,1 kb RNA Spezies translatiert, die 3,5 kb RNA (Pregenom) kodiert für das HBcAg und die DNA Polymerase, die ca. 0,8 kb lange RNA könnte für das HBx Protein kodieren.

Molekulare Klonierung und Nukleotidsequenzierung der HBV Genome des Subtyps adr (Fujiyama, 1983; Ono, 1983), adw (Ono, 1983), adyw (Pasek, 1979) und adw2 (Valenzuela, 1980) führten zur Identifizierung der vier großen ORFs, die sämtlich vom (-) DNA Strang kodiert werden und in allen HBV Subtypen konserviert sind (Abb. 2). Diese ORFs werden als S, C, P und X bezeichnet. Sie sind überlappend angeordnet, d.h. es werden alle drei möglichen Leseraster verwendet. In der viralen DNA existieren keine Introns. Die kodierende Region für das HBsAg (ORF S; Position 155-832) ist in 3'-Richtung in Phase mit einem Leserahmen (ORF preS; Position 2821-154) der in zwei funktionale Regionen, preS1 (Position 2821-312) und preS2 (Position 313-154) unterteilt wird.

10	30	50	70	90	110
TTCCACAACTCCACCAAGCTCTCTAGATCCAGAGTGGGGGCTATATTTCTCTGC			TGTTGGCTCCAGTTCCGGAACAGTAAACCTCTTCGGACTACTGCTCACCCATATCTGC		
130	150	170	190	210	230
AATCTCTCGAGGACTGGGACCTCGACCCAACTGAGAAACAAATCAGGATTCCT	⁴⁻⁵		AGGACCCCTGGCTGTTACAGGCGGGTTTTCTTGTGACAAGATCTCCACAATACC		
250	270	290	310	330	350
ACAGAGCTAGACTCTGGTGAATCTCTCAAATTTCTAGGGGAGCACCCAACTGTCT			TGGCCAAATTCGAGTCCCACTCAATCACTCACCACTCTGTCTCTCAATTTG		
370	390	410	430	450	470
TCTGGCTATGGCTGATGTGTCTGGCGGCTTTATCATATCTCTCTCATCTGCTGT			ATGCTCATCTCTCTGTGGTCTCTGGACTACCAAGGTATGTTGGCGGTTGTCTCT		
490	510	530	550	570	590
ACTTCAGGAACATCAACCACGAGCGGGGCGATGCAAGACCTGCAGATCTCTGTCA			AGGAACCTCTATGTTCTCTCTCTGTGTCTGTACAAACCTTCGGAGGAACTGCACCTG		
610	630	650	670	690	710
TATTCCTATCCATCATCTCTGGGCTTCGCAAGATTCCTATGGAGTGGGCTCAGTCCG			TTCTCTCTGGCTCAGTTTACTATGTCAGTCTTGTTCAGTGGTTGTAGGGCTTTCGCCAC		
730	750	770	790	810	830
TGTCTGGCTTTCAGTTATATATGATGGGAACTGGGGGCAAGTCTGTACAACATCTT	^{Enhancer}		GAGTCCCTTTTACCTATATACCAATTTCTTTGTCTTGGGTATACATTTAAACCT	⁵	
850	870	890	910	930	950
AATAAAACCAAACTGGGGTACTCTCCCTTAACCTCATGGGATATTAATGGAAGTTGG			GGTACTTTACCCAGGAACATATGTACTAAALCACTGAAGATGTTTCCGAAATTCCTT		
970	990	1010	1030	1050	1070
GTAAATGCCCTATTGATGGAAGTATGTCAAAGAACTTGTGGCTCTTTGGGCTTTGCT			GCCTCTTTACACAATCGGCTATCTGGCTGTGARGCTTTATATGCTATATGAATCT		
1090	1110	1130	1150	1170	1190
AAGCAGGCTTTCACCTTCTCGCCAACTATAGGCGCTTCTGTGTAAACAATATCTGAAC			CTTTACCCGCTTGGGCAACGGTCAGGTCTCTGCAAGTCTTGTGACCGCAACCCG		
1210	1230	1250	1270	1290	1310
ACTGGATGGGGCTTGGCCATAGGCCATCGGCGCATGGTGAACCTTGTGGCTCTCTG			CCGATCCATACTCGGAACTCTAGCAGCTGTTTGTCTCGCAGCGCTTCGGAGGAAA		
1330	1350	1370	1390	1410	1430
CTTATCGAAGCGACAATCTGTCTGTCTCTCTCGGAAATACACCTCTCTCTCTGCTG	^{103K}		CTAGGGTGTGTCTGCAACTGGATCTCTCGCGGGGACGCTCTTGTCTACGTCCTGTGGG		
1450	1470	1490	1510	1530	1550
CTGAATCCCGCGGACCGCTCTCGGGGCGCTTGGGGCTCTACCGTCCCTCTCTCTT			CTGCCCTTCCGGCGACACGGGGCGCACTCTCTTACCGGCTCTCCCGCTCTGTGCT		
1570	1590	1610	1630	1650	1670
TCTCATCTCGCGGACCGTGTCACTTGTCTCACTCTGCGACGTGCGATGGAGACCGG			^P TGAACGCGCCACAGGCTTGTCCCAAGGCTCTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCA		
1690	1710	1730	1750	1770	1790
TGTCAACGACCGACCTTGGGCACTCTCAAAGACTGTGTCTTAAAGACTGGAGAGT			^{DATA: 403, 103c}		
1810	1830	1850	1870	1890	1910
CCTCTGCTTATCATCTCTCTCTCATGTCTCAAGCTCCAAAGCTGTGCTGTGG	^{D1-C}		²		
1930	1950	1970	1990	2010	2030
CTCTTTTGGCTCTGACTCTCTTCTGCTATTCGAGATCTCTTGACACCGCTCTGC			^{103-1A}		
2050	2070	2090	2110	2130	2150
CGAGCTATCTGTGTGGGTGAGTAAATGAATCGGCACCTGGGTGGGAAGTAATTT			GGAAGACCCAGCATCCAGGAATTAGTAGTCACTGTCTAATGTAAATGGGCTAAA		
2170	2190	2210	2230	2250	2270
AATCAGCAACATATGTGGTTTCACATCTCCCTCTACTTTGGAAGAGAACTGTTTT			GGAGTATTGGTATCTTTGGAGTGTGATTCGCACTCTCTCCGCTTACGACCAACCA	²	



Abb. 2: Nukleotidsequenz des Hepatitis B Virus, Subtyp adr

Die Nukleotidsequenz des Subtyps adr (Fujiyama, 1983; Ono, 1983) ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die ORFs preS, S, preC, C, P und X sowie Promotoren, Enhancer, Poly(A)Signal und die in diesem Subtyp zusätzlich vorhandenen 33 bp sind markiert.

Das HBsAg Gen und die preS2 Region sind, im Gegensatz zur preS1 Region, in allen HBV Subtypen konstant. Der Serotyp adr besitzt gegenüber den ay Serotypen eine zusätzliche 33 bp Insertion (Position 2823-2855), wohingegen der Subtyp adw noch 12 dieser 33 bp enthält. Das HBcAg Gen (Position 1874-2422) ist in 3'-Richtung in Phase mit dem ORF preC (Position 1818-1873). Der 80% des HBV Genoms umfassende ORF P (Position 2280-1620) kodiert vermutlich für die endogene DNA Polymerase. Die Funktion(en) und das (die) Produkt(e) des ORF X (Position 1374-1811) sind nur wenig charakterisiert (siehe Kap. 2.2).

Für die auf dem (+) Strang befindlichen kurzen ORFs konnten bisher keine Genprodukte nachgewiesen werden (Tiollais, 1981). Einer dieser Leserahmen kann jedoch in vitro transkribiert werden (Standring, 1983).

2.1 Transkriptionselemente

Die Transkriptionselemente des HBV Genoms wurden vorrangig in artifiziellen Systemen (in vitro Transkriptionssysteme oder HBV infizierte Schimpanzenleber) aufgeklärt. Erst seit kurzem ist es möglich, HBV auch in der Zellkultur zu propagieren (Surreau, 1986; Chang, 1987; Tsurimoto, 1987).

In infizierter Schimpanzenleber konnten hauptsächlich zwei HBV spezifische poly (A)⁺ RNAs nachgewiesen werden (Cattaneo, 1983; Cattaneo, 1984), eine 2,1 kb und 3,5 kb RNA. Eine 2,3 kb RNA konnte ferner in vitro nachgewiesen werden (Standring, 1983).

Die Transkription der 2,1 kb RNA, deren 5'-Ende ca. 20 bp vor dem AUG der preS2 Region liegt, erfolgt vom Promoter SPII aus; sie umspannt die preS2 Region und die Gene S und X (Abb. 1). Der, in der preS1 Region lokalisierte SPII Promoter (CCTACTCC, Position 3133-3140;

Cattaneo, 1983) zeigt starke Sequenzhomologie zum späten Promoter des Simian Virus (SV) 40. Für die Aktivität des SPII Promoters ist die 190 bp "downstream" befindliche Bindungsstelle für den "nuclear factor I" (NFI) von Bedeutung (Shaul, 1986), denn die Deletion dieser Bindungsstelle vermindert die Aktivität des SPII Promoters. Die den gesamten ORF preS und S umfassende 2,3 kb RNA hingegen wird vom SPI Promoter exprimiert (Rall, 1983). Das 5'-Ende dieser RNA ist vor der preS1 Region in Position 2810 lokalisiert. Der SPI Promoter (TATAAG, Position 2751-2756; Pourcel, 1982; Gough, 1983) stellt eine TATA-Box dar. Die dritte RNA Spezies ist 3,5 kb lang und folglich terminal redundant. Diese RNA, deren 5'-Terminus in der preC Region liegt, wird auch als Pregenom bezeichnet, da sie die Matrize für die Synthese des (-) DNA Strangs durch reverse Transkription darstellt (siehe Kap. 4). Die Transkription der 3,5 kb RNA wird vom HBc Promoter, einer TATA-ähnlichen Sequenz (TACATAAG, Position 1651-1658); Rall, 1983), reguliert. Alle diese RNAs sind nicht gesplitt, besitzen (+) Strang Polarität und haben die gleiche 3'-Polyadenylierungsstelle (Position 1889), wohingegen die 5'-Enden heterogen sind. Bei der Synthese der 3,5 kb mRNA muß das Poly (A) Signal somit einmal überlesen werden. Dieses Phänomen wurde bereits für Retroviren und Retrotransposons beschrieben.

Es konnten keine ORF X oder ORF P spezifischen RNAs in Zellen während der Replikation von HBV nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür könnte ihr nur geringes Vorkommen sein. Lediglich in heterologen Systemen (Laub, 1983; Saito, 1986) konnte eine ca. 0,8 kb lange ORF X mRNA entdeckt werden. Multiple Initiationsstellen dieser RNA wurden durch S1 Nuklease kartiert (Positionen 1225, 1280 und 1300; Siddiqui, 1987). In der 5'-Region vor dem HBx Gen befindet sich ein Promoter (Sid-

diqui, 1987; Wollersheim, 1987), der die Transkription dieses Gens steuern könnte. Ein Promoter für die Transkription des P Gens konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres regulatorisches Element auf dem HBV Genom ist eine Enhancersequenz (Position 745-754; Shaul, 1985; Tognoni, 1985), welche die Expression des HBs Gens (Chang, 1987) und des HBc Gens (Jameel, 1986; Tur-Kaspa, 1986) stimuliert. Ferner befindet sich eine Glucocorticoid-Rezeptorsequenz im HBs Gen (Position 351-366; Tur-Kaspa, 1986), deren Bedeutung in der Geschlechtsspezifität des HBV liegen könnte; es erkrankten nämlich mehr Männer als Frauen an Hepatitis B. Die HBs Gen-Transkription konnte in transgenen Mäusen durch Testosteron, Estradiol und Dexamethason erhöht werden (Farza, 1987).

2.2 Genprodukte

Die Hülle des Virions enthält drei Proteine, die als Haupt (major)-, Mittel (middle)- und Große (large)-Proteine bezeichnet werden (Stibbe, 1983; Heermann, 1984). Ein Dane Partikel enthält 300-400 "major"-Proteine sowie 40-80 "middle"- und "large"-Proteine. Die Proteinzusammensetzung der Filamente ist damit identisch, wohingegen die kugelförmigen Partikel etwa 20 mal weniger vom "large"-Protein enthalten.

Das "major"-Protein wird vom HBs Gen kodiert und von der 2,1 kb RNA translatiert. Es ist 226 AS lang und existiert in einer glykosylierten (GP 27^S) und einer nicht-glykosylierten (P 24^S) Form. Das "middle"-Protein besteht aus 281 AS, wird durch die preS2 Region und das HBs Gen kodiert, und kommt in zwei unterschiedlich stark glykosylierten Formen (GP 33^S und GP 36^S) vor.

Die zusätzlichen 55 AS der preS2 Region bilden ein dominantes Epitop auf der Virushülle, das stärker immunogen wirkt als die Epitope des "major"-Proteins (Neurath, 1985). Berücksichtigung der preS2 Epitope in HBV Vakzinen könnte das Problem, daß einige Individuen gar nicht oder nur schlecht zu immunisieren sind (Hadler, 1986) lösen (Tiollais, 1985; Übersichtsartikel). Die preS2 Region kodiert außerdem den Rezeptor für polymerisiertes humanes Serumalbumin (pHSA; Machida, 1984; Philipson, 1981). Dieser Rezeptor ist vermutlich für den Kontakt zwischen HBV und Hepatozyten verantwortlich; Hepatozyten besitzen ebenfalls einen Rezeptor für pHSA (Thung, 1983). Das "large"-Protein wird von der preS1, preS2 und S Region kodiert und von der 2,3 kb RNA translatiert. Es ist 389 AS (Serotypen ay) oder 400 AS (Serotypen ad) lang und kommt in einer glykosylierten (GP 42^S) und nicht-glykosylierten (P 39^S) Form vor.

Das HBc Gen kodiert für das 22 kD große Kapsidprotein HBcAg (P 22^C). Dieses Protein wird von der 3,5 kb RNA Spezies translatiert (Pourcel, 1982; Gough, 1983). Der C-Terminus des HBcAg ist aufgrund des hohen Anteils an Arginin, Serin und Prolin stark basisch, weswegen eine Interaktion des Nukleokapsids mit der viralen DNA angenommen wird (Petit, 1985). Initiation der Translation am AUG der preC Region (Position 1818) führt zu einem hydrophoben Protein. Durch vermutlich autokatalytische Proteolyse (Miller, 1987), unter Abspaltung des basischen C-Terminus des HBcAg, entsteht ein ca. 16 kD großes Antigen, das sog. HBeAg. Dieses kann im Serum HBV infizierter Patienten nachgewiesen werden. HBcAg hingegen wird hauptsächlich im Kern (Akiba, 1987), HBsAg im Zytoplasma und auf der Oberfläche infizierter Hepatozyten gefunden.

Das Genprodukt des ORF P ist die im Nukleokapsid vorkommende DNA Polymerase, wobei die Translation vermut-

lich ebenso wie die des HBcAg von der 3,5 kb RNA erfolgt. Dieses Protein füllt die "gap"-Region auf durch Elongation des 3'-Endes des (+) DNA Strangs. Das basische 90 kD Protein besitzt vermutlich auch die für die HBV Replikation notwendige reverse Transkriptaseaktivität, wie aus einem AS-Sequenzvergleich mit der reversen Transkriptase aller bisher sequenzierten Retroviren abgeleitet wurde (Toh, 1983; Miller, 1986).

Der ORF X kodiert, abhängig vom Subtyp, für ein ca. 16 kD großes Protein aus 145-154 AS. Es ist bisher nicht geklärt, ob die Translation des HBx Proteins von einer HBx spezifischen RNA erfolgt oder, ob hierfür splicing-Transkripte der, die HBx Region enthaltenden 2,1 kb, 2,3 kb oder 3,5 kb RNA benutzt werden. Mit Antikörpern gegen X-spezifische synthetische Polypeptide konnte in einer infizierten Leber ein Protein von 28 kD nachgewiesen werden (Moriarty, 1985). Außerdem wurden in einigen Seren von PLC Patienten anti-HBx Antikörper gefunden (Kay, 1985; Moriarty, 1985). Ein HBx spezifisches Protein konnte kürzlich auch während der HBV Replikation nachgewiesen werden (Chang, 1987). Die Funktion des HBx Proteins ist noch nicht geklärt, obwohl bereits eine transaktivierende Wirkung der X-Region auf verschiedene virale Promotoren festgestellt werden konnte (Wollersheim, 1987; Zahm, 1987).

3. Animale Hepadnaviren

Das HBV gehört zur Gruppe der Hepadnaviren (Hepatotrophe DNA Viren), der neben HBV auch das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV; Summers, 1978), das Duck Hepatitis Virus (DHBV; Mason, 1980), das Ground Squirrel Hepatitis Virus (GHBV; Marion, 1980), das Tree Squirrel Hepatitis B Virus (THBV; Feitelson, 1986) und das erst

kürzlich entdeckte Heron Hepatitis B Virus (HeHBV; pers. Mitt. H.Will) angehört.

Allen gemeinsam ist die ähnliche Struktur der Virionen, die Größe des Genoms, die genomische Organisation, der Replikationsmechanismus, das enge Wirtsspektrum, der relative Hepatotropismus, die Infektiösität der klonierten viralen DNA nach Injektion in Species-spezifisches Lebergewebe (Will, 1985) und die Möglichkeit zu persistierenden Virusinfektionen (Robinson, 1982). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wird für die Hepadnaviren ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung angenommen. Hinsichtlich der genomischen Organisation wurde nur ein größerer Unterschied zwischen DHBV und den übrigen Vertretern der Hepadnagruppe festgestellt. DHBV besitzt keine X-Region, wohingegen ein wesentlich größerer ORF C vorliegt, der X homologe Sequenzen enthält (Sprengel, 1985).

4. Replikation

Für die Replikation des HBV Genoms wird ein Vierstufen-Mechanismus postuliert (Seeger, 1986; Will, 1987; Ganem, 1987; Übersichtsartikel):

- 1) Im Nukleus infizierter Hepatozyten findet zuerst eine Konversion der partiell doppelsträngigen Virion DNA zu einem kovalent geschlossenen zirkulären DNA Molekül (ccc DNA) statt (Miller, 1984);
- 2) Die Transkription des (+) Strangs der ccc DNA vermutlich durch die zelluläre RNA Polymerase führt zu einer 3,5 kb großen RNA, die das gesamte HBV Genom umspannt und terminal redundant ist (Pregenom; Summers, 1982). Dieses RNA Pregenom wird in Virushüllen verpackt;
- 3) Das RNA Pregenom wird, unter Verwendung eines noch

nicht näher charakterisierten Proteins als "Primer", revers transkribiert. Die Initiation der reversen Transkription erfolgt innerhalb der DR1 Sequenz. Auf diese Weise wird der (-) DNA Strang generiert, der eine terminale Redundanz von 5-8 bp aufweist. Gleichzeitig wird, vermutlich durch RNase H katalysiert, das Prege-nom bis auf ein kurzes RNA Oligomer degradiert, welches mit der DR2 Sequenz hybridisiert;

4) Der (-) Strang dient als Matrize zur Synthese des (+) DNA Strangs unter Beteiligung der viralen DNA Polymerase. Das unter 3) beschriebene RNA Oligomer wird als "Primer" benutzt, um den (+) Strang bis zum 5'-Terminus des (-) Strangs zu elongieren. Durch die terminale Redundanz des (-) DNA Strangs wird ein intramolekularer "template switch" ermöglicht, wodurch die Transkription am 3'-Ende des (-) Stranges fortgesetzt werden kann. Der "template switch" ist aufgrund des "nick" im (-) DNA Strang notwendig.

5. Biologische und klinische Aspekte der HBV Infektion

Hauptcharakteristiken der HBV Infektion sind Art-Spezifität und relativer Hepatotropismus. Für HBV stellen ausschließlich der Mensch und höhere Primaten permissive Wirte dar (Maynard, 1972), wobei virale Antigene und HBV DNA hauptsächlich in Hepatozyten gefunden werden. Aufnahme und Persistenz des HBV kann jedoch auch in anderen Geweben als der Leber stattfinden (Blum, 1983). Virale DNA wurde bereits in Leukozyten (Laure, 1985; Noonan, 1986) und Knochenmark (Elfassi, 1984), seltener in Haut (DeJean, 1984a) und Pankreas (Brecht, 1984) nachgewiesen. In einigen dieser Zellen konnten replikative HBV DNA Intermediate nachgewiesen werden, die sich strukturell von denen in produktiv infizierten Hepato-

zyten unterscheiden. Der Mechanismus der HBV Replikation sowie die biologischen Konsequenzen extrahepatischer viraler Persistenz sind nicht bekannt.

HBV wird horizontal (parenteral, sexuelle Kontakte) oder vertikal (perinatal) übertragen. Die verschiedenen Verlaufsformen der Virus B Hepatitis sind in Abb. 3 zusammengefaßt.

Nach einer Inkubationszeit von 50-180 Tagen entwickeln etwa 20% der Infizierten eine klinisch akute Verlaufsform, welche laborchemisch durch einen hohen Anstieg der Bilirubin- und Transaminasen-Werte charakterisiert ist. Bei etwa 1% der HBV Infizierten verläuft die Krankheit fulminant und führt innerhalb weniger Tage zum Tod des Patienten, wohingegen bei ca. 80% aller Hepatitis B Patienten ein subklinisches, inapparentes Erscheinungsbild auftritt. In 90-95% aller Primärinfektionen kann das Virus innerhalb von sechs Monaten eliminiert, und eine dauerhafte Immunität gegen Reinfektion erzielt werden. Bei 5-10% der HBV Patienten, welche die Primärinfektion nicht überwinden können, tritt ein chronisches Trägerstadium ein, das durch ein oft lebenslanges Auftreten von HBsAg im Serum gekennzeichnet ist. Weltweit gibt es über 200 Millionen chronische HBV Träger, wobei die Durchseuchung in endemischen Gebieten (Äquatorial-Afrika, Ostasien) bis zu 10% der Bevölkerung betrifft (Szmunn, 1978). Ein Teil dieser Patienten (5-20%) werden, da keine erhöhten Transaminase-Werte gefunden werden, als "gesunde" HBV Träger ("healthy carrier") bezeichnet. Die meisten der chronisch Infizierten entwickeln jedoch eine chronische Hepatitis, die laborchemisch durch erhöhte Transaminasen- und Bilirubin-Werte gekennzeichnet ist. Es wird dabei zwischen der chronisch-persistierenden und der chronisch-aggressiven Verlaufsform unterschieden.

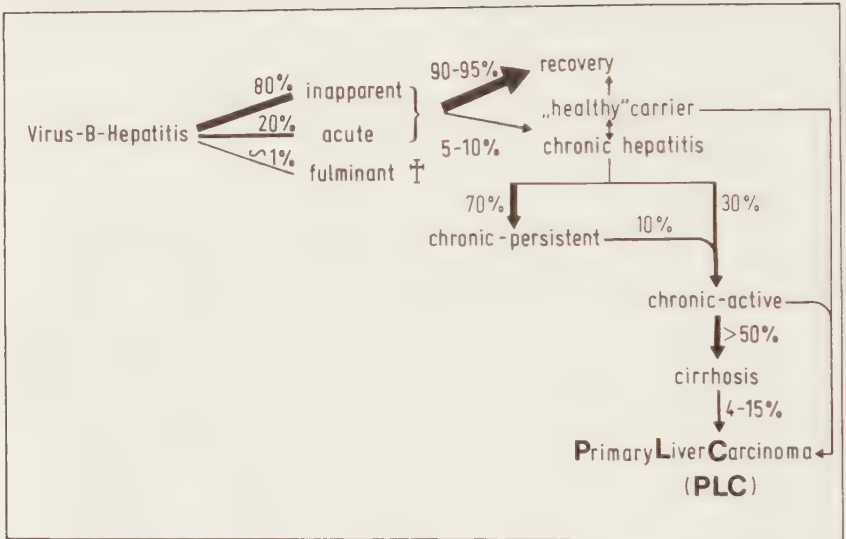


Abb. 3: Krankheitsverläufe einer Hepatitis B Virus Infektion

Eine Primärinfektion mit HBV kann inapparent, akut oder fulminant verlaufen. Sie kann ausheilen ("recovery") oder in ein chronisches Stadium ("healthy carrier" oder "chronic hepatitis") übergehen. Die chronische Hepatitis ("chronic hepatitis") wird unterteilt in eine chronisch-persistierende ("chronic persistent") und eine chronisch-aggressive ("chronic active") Verlaufsform. Aus der chronisch-aggressiven Hepatitis kann eine Leberzirrhose ("cirrhosis") und das primäre Leberzellkarzinom ("Primary Liver Cancer", PLC) entstehen.

Die chronisch-persistierende Hepatitis ist durch ein lymphozytäres Infiltrat der Periportalfelder charakterisiert, wohingegen bei der chronisch-aggressiven Form

das lymphozytäre Infiltrat über die Periportalfelder hinausgeht. Die persistierende Form ist eine im allgemeinen lebenslange Infektion, die klinisch asymptomatisch verlaufen kann oder mit unterschiedlichen Schweregraden chronischer Leberschädigung einhergeht (Hoofnagle, 1984). Über 50% der Patienten mit einer chronisch-aggressiven Virus B Hepatitis entwickeln eine Leberzirrhose, wovon 4-15% nach einer Latenzzeit von bis zu 20 Jahren ein primäres Leberzellkarzinom (PLC) entwickeln. Ein PLC kann sich jedoch auch direkt, sowohl aus dem chronisch-aggressiven als auch dem "healthy carrier" Status ergeben. Jährlich sterben etwa 1 Million Menschen an diesem PLC (Blumberg, 1980).

Für den Verlauf einer HBV Infektion auf molekularer Ebene wurde ein Zweiphasen-Mechanismus postuliert (Hadziyannis, 1983; Shafritz, 1984): 1) eine frühe, permissive Phase die durch das Auftreten von replikativen HBV DNA Intermediaten gekennzeichnet ist und, 2) eine späte, nicht-permissive Phase während derer keine HBV Replikation mehr auftritt und virale DNA in Wirtschromosomen integriert.

Die Genese der unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen der Virus B Hepatitis ist ungeklärt. Prinzipiell können die unterschiedlichen HBV Subtypen oder/und verschiedene Reaktionen des Wirts den Infektionsverlauf beeinflussen.

Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, daß Unterschiede in der Nukleotidsequenz der HBV Subtypen (Eisenburg, 1982) oder in der Struktur der viralen DNA (partiell bzw. vollständig doppelsträngig; Ruiz-Opazo, 1982) eine Rolle spielen. Hingegen beeinflussen offensichtlich zelluläre Faktoren den Verlauf einer Hepatitis B Infektion entscheidend. Sicherlich sind genetische Faktoren von Bedeutung, denn 1) bei Afrikanern und Asiaten tritt das

PLC häufiger auf als bei anderen Rassen (Szmunness, 1978) und, 2) männliche HBsAg-Träger entwickeln 3-6 mal häufiger als weibliche einen derartigen Tumor (Beasley, 1984). Neben der genetischen Situation werden individuelle Variationen im Schweregrad der Leberschädigung auch einer unterschiedlichen Immunantwort auf die viral infizierten Zellen zugeschrieben (Dienstag, 1984). Studien an immunsupprimierten Patienten mit chronischer Virus B Hepatitis, die trotz hoher Virustiter nur geringe Leberschäden aufwiesen, zeigten, daß die HBV Infektion an sich nicht direkt zytotoxisch auf Hepatozyten wirkt (Rustgiv, 1984). Die Zellyse scheint somit indirekt durch zytotoxische T-Zellen stattzufinden. Als virales Target der T-Zellrezeptoren konnte HBcAg identifiziert werden, das in geringer Konzentration auf der Hepatozytenoberfläche vorkommt (Pignatelli, 1987). Im Verlauf verschiedener Virusinfektionen (z.B. Masern, Influenza) konnte nachgewiesen werden, daß zytotoxische T-Lymphozyten virale Targets nur als Komplex mit Klasse I HLA Proteinen erkennen können (Gerber, 1985; Übersichtsartikel). Ein Defekt im Immunsystem oder eine gestörte HLA Expression könnte eine nicht vollständige Eliminierung infizierter Leberzellen (Popper, 1982) und damit die Entwicklung einer persistierenden Virusinfektion zur Folge haben. Als weitere Alternative ist auch eine Maskierung der viralen Targets durch anti-HBc Antikörper denkbar, welche mit den zytotoxischen T-Zellen um das HBcAg kompetitieren.

6. HBV Infektion und Primäres Leberzellkarzinom (PLC)

Das PLC gehört weltweit zu den häufigsten Krebsarten. Der größte Teil humaner PLCs scheint kausal mit der Persistenz des HBV in Hepatozyten verknüpft zu sein

(Beasley, 1982). Hierfür gibt es die folgende Evidenz:

- 1) Es besteht eine geographische Korrelation zwischen der hohen Rate an chronischer HBV Infektion und einer erhöhten Incidenz an PLC, besonders in Südostasien und Teilen von Äquatorial-Afrika (Szmuness, 1978).
- 2) In einer prospektiven Studie in Taiwan wurde festgestellt, daß HBsAg Träger ein, im Vergleich zu Nicht-Infizierten, 390 fach erhöhtes PLC-Risiko besitzen (Beasley, 1981).
- 3) In vielen Tumoren und davon abgeleiteten Zelllinien ist die virale DNA im Genom der Wirtszelle integriert (Kam, 1982).
- 4) Hepatozelluläre Karzinome können in Tiermodellen nach chronischer Infektion mit Hepadnaviren induziert werden. Die Incidenz, bis zu 100% zwei Jahre nach Infektion, ist besonders hoch in woodchucks (Chen, 1986). Tumore in infizierten ground squirrels (Marion, 1986) und ducks (Yokosuka, 1985) treten hingegen mehr sporadisch auf und sind nicht eindeutig mit der Virusinfektion in Zusammenhang zu bringen.

7. Struktur integrierter HBV DNA in Tumoren

Detaillierte Untersuchungen verschiedener integrierter HBV DNA Sequenzen aus primären hepatozellulären Karzinomen (Ogston, 1982; DeJean, 1984; Mizusawa, 1985; Rogler, 1985; DeJean, 1986) und Tumorzelllinien (DeJean, 1983; Koike, 1983; Koshy, 1983; Koch, 1984; Shaul, 1984; Ziemer, 1984) zeigten, daß die Integration des HBV ins Wirtsgenom unspezifisch erfolgte. Die integrierte virale DNA kann subgenomische Größe besitzen oder aus Multimeren bestehen; sie kann kolinear mit dem HBV Genom sein oder durch eine oder mehrere Deletionen oder Inversionen rearrangiert vorliegen; die viralen

ORFs können intakt sein oder auch nicht; die, zur integrierten HBV DNA flankierenden, humanen DNA Sequenzen stehen in keiner offensichtlichen Beziehung weder zueinander noch zu den Rekombinationsstellen innerhalb der viralen DNA; die Integration kann in verschiedene Chromosomen stattfinden, wobei große Deletionen oder kleine Duplikationen an der Integrationsstelle auftreten können. Alle diese Charakteristiken erinnern an die Integration von Papovavirus DNA oder an die Transfektion von DNA in Wirtschromosomen (Tooze, 1980). Dagegen verläuft die Integration retroviraler Proviren in Wirtschromosomen nach einem geordneten Mechanismus (Varmus, 1982).

Untersucht man die Integrationsstellen auf der Ebene der viralen DNA so fällt auf, daß oft Sequenzen in oder nahe der "direct repeats" (DR), im "gap"-Bereich, als Rekombinationsstellen benutzt werden. Dies könnte durch den bevorzugten Gebrauch freier Enden der Replikationsintermediate bei der Integrationsreaktion bedingt sein. Ein weiteres Argument gegen einen spezifischen Integrationsmechanismus ist durch die beträchtliche Heterogenität der terminalen Nukleotide der integrierten HBV DNA, die Verknüpfungsstellen neben oder innerhalb der DRs besitzt, gegeben.

8. Modelle der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese

Die Rolle des HBV bei der Entstehung des PLC ist auf der molekularen Ebene noch nicht geklärt. Klassische Modelle der viralen Onkogenese stellen die "cis"- und "trans"-Mechanismen dar, welche die Wechselwirkungen zwischen Virus- und Wirts- DNA beschreiben. Bei den cis-Mechanismen geht man von einer direkten Wirkung der viralen DNA entlang eines DNA Moleküls aus, wohingegen

die trans-Mechanismen eine intermolekulare Wechselwirkung zwischen einem löslichen, viralen Genprodukt und einer zellulären Zielsequenz annehmen. Trans-Mechanismen sind im Gegensatz zum cis-Modell unabhängig von einer ortsspezifischen Integration des Virus in das zelluläre Genom.

8.1 Direkte HBV-spezifische Onkogenwirkung

Ein viral kodierte Protein bewirkt direkt die maligne Transformation der Zelle. Viele RNA und DNA Tumoviren tragen Onkogene, deren Proteine (z.B. pp 60^{src} von RSV, T-Antigen von SV40) direkt die maligne Transformation kultivierter Zellen auslösen und in geeigneten Wirtstieren Tumore induzieren (Bishop, 1985; Übersichtsartikel). Mehrere Gründe sprechen dagegen, daß HBV ein virales Onkogen enthält:

- 1) Die lange Latenzzeit zwischen der Primärinfektion und dem Auftreten von hepatozellulären Karzinomen von bis zu 40 Jahren. Ein onkogenes Protein würde relativ schnell eine maligne Transformation auslösen.
- 2) Durch Transfektion kultivierter Zellen mit HBV DNA konnte keine zelluläre Transformation bewirkt werden.
- 3) Das Genom von Hepadnaviren zeigt keine Homologie mit normalen zellulären Genen, so daß es unwahrscheinlich ist, daß Hepadnaviren, wie die stark onkogen wirkenden Retroviren, Gene tragen die vom Wirtsgenom transduziert worden sind.
- 4) Nach Integration viraler DNA in das Wirtsgenom verbleibt kein universell erhaltener ORF, den man für ein Onkogen, das den transformierten Status bewirkt, erwarten würde.

8.2 "cis"-Mechanismen

Für einen cis-Mechanismus kommen auf der molekularen Ebene verschiedene Möglichkeiten in Frage:

1. Fall: Bei der insertionellen Mutation werden virale Promotoren oder Enhancer bereitgestellt, welche die Expression benachbarter zellulärer Gene erhöhen und dadurch zur malignen Transformation der infizierten Zelle beitragen (Varmus, 1984). So aktivieren einige Retroviren wie z.B. das Avian Leukosis Virus (ALV; Hayward, 1981) die Expression von c-myc oder anderen Proto-onkogenen durch insertionelle Mutation. Es ist in der Literatur nur ein einziger Fall eines PLC beschrieben, der diesem Modell entsprechen könnte. DeJean et al., (1986) fanden in einem frühen hepatozellulären Karzinom, daß die integrierte HBV DNA in Phase mit einer zellulären Sequenz fusioniert ist, die für ein zum erbA Proto-onkogen Produkt homologes Protein kodiert. Ob jedoch dieses Protein neoplastische Aktivität in Leberzellen besitzt, ist nicht bekannt.

2. Fall: Durch die Fusion eines viralen und humanen Strukturgens könnte ein Genprodukt neuartiger Funktion entstehen, das die maligne Transformation auslöst. In der Hepatom-Zelllinie PLC/PRF/5 konnten virale/zelluläre Fusionstranskripte nachgewiesen werden (Loringhoven, 1985; Ou, 1985), deren Relevanz für den neoplastischen Prozeß jedoch ungeklärt ist, zumal in dieser Zelllinie mindestens sieben verschiedene HBV DNA Integrate enthalten sind.

3. Fall: Durch die Integration viraler Sequenzen wird, z.B. durch die Deletion genomischer DNA, ein Suppressorgen (anti-Onkogen) inaktiviert. Ein Suppressorgen ist für die Aufrechterhaltung des "normalen" Status der Zelle verantwortlich. Tatsächlich entstehen einige Tumore wie Retinoblastome (Caveanee, 1985), Wilms Tumore (Nephroblastome; Orkin, 1984), Osteosarkome (Hansen,

1985) und Hepatoblastome (Koufos, 1985) durch eine rezessive Mutation definierter Loci der humanen Chromosomen 13 (q 14) und 11 (p 13). Rogler (1985) konnte in einem PLC nachweisen, daß durch die Insertion der HBV DNA eine 12 kb Deletion in Chromosom 11 auftrat. Die deletierten Sequenzen liegen jedoch außerhalb der Domäne die in Wilms Tumoren und anderen Neoplasmen (Glaser, 1986) eine Rolle spielt.

Ein cis-Mechanismus scheint aufgrund der ortsunspezifischen Integration des Virus als allgemeines Modell für die HBV assoziierte Hepatokarzinogenese wenigstens nicht generell in Frage zu kommen. Als ein alternativer oder zusätzlicher Faktor im Transformationsgeschehen bleibt ein transregulatorisches Element des HBV Genoms zu berücksichtigen.

8.3 "trans"-Mechanismen

Ein viral kodierte Protein (oder theoretisch auch eine RNA) trägt indirekt, durch Änderung des Expressionsmusters zellulärer Gene, zur Onkogenese bei. Die Transaktivierung der Genexpression auf transkriptioneller und translationeller Basis wurde bereits für das humane T-Zell lymphotrophe Virus Typ I (HTLV-I) beschrieben (Sodroski, 1984). Seitdem wurde die Transaktivierung auch als Eigenschaft anderer RNA Viren wie Visna (Hess, 1985) und dem akut transformierenden Rous Sarcoma Virus (RSV; Broome, 1985) beschrieben. Den DNA Tumoviren SV40 (Sassone-Corsi, 1985), Adenovirus (Stein, 1984), bovine papilloma virus (BPV; Lusk, 1985) und Herpes Viren (El Kereh, 1985) konnte ebenfalls eine transaktivierende Funktion nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, daß auch das Hepatitis B Virus eine transaktivierende Funktion besitzt, welche von

der X-Region kodiert wird (Wollersheim, 1987; Zahm, 1987). Inwieweit diese transaktivierende Funktion des HBV mit der Hepatokarzinogenese in Beziehung steht bleibt zu untersuchen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Moroy et al. (1986) in einigen Hepatomen von WHV infizierten woodchucks nachweisen konnten, daß das c-myc Proto-onkogen rearrangiert, und in drei von neun dieser Tumore überexprimiert wird, wobei die WHV DNA nicht in Nachbarschaft zu diesem Proto-Onkogen vorliegt.

8.4 Multifaktorielle Mechanismen

Die sehr lange Latenzzeit (bis zu 40 Jahren) zwischen HBV Infektion und Entstehung eines PLC sowie die geographische Verteilung der PLC Häufigkeit (vgl. Kap. 6) legt nahe, daß HBV vermutlich notwendig aber nicht hinreichend ist für die Tumorgenese und, daß andere Risikofaktoren wie Alkohol, Mykotoxine (z.B. Aflatoxin), Wasserqualität eine Rolle spielen (Peters, 1976; Wogan, 1976).

Auf der genetischen Ebene konnten in einer Vielfalt menschlicher Tumore chromosomale Translokationen, Genamplifikationen, Rearrangements und Punktmutationen nachgewiesen werden die Proto-onkogene zu Onkogenen umwandeln (Varmus, 1984; Übersichtsartikel). Solche Mutationen sind auch für einige PLCs beschrieben worden; doch es gibt keine Evidenz, daß eine HBV Infektion kausal mit derartigen Veränderungen in Zusammenhang steht (Ganem, 1987; Übersichtsartikel).

Kürzlich ergab die karyotyp-Analyse der humanen Hepatom-Zelllinie huH-4, die über 70 Chromosomen besitzt, daß mehrere Translokationen stattgefunden haben, wobei

eine Translokation auch das Chromosom 7 (q) erfaßt hat (pers. Mitt. N. Arnold, Universität München). Der Bruchpunkt befindet sich dabei in einem Bereich in dem sich das erbB Proto-onkogen befindet. Die Northern Analyse der huH-4 Zelllinie soll nun zeigen, ob das Expressionsmuster dieses Proto-onkogens verändert ist, und damit ein Zusammenhang zur malignen Transformation bestehen könnte. Hierbei bleibt zu berücksichtigen, daß durch Inkulturnahme und Passagierung einer Zelllinie oft sekundäre Chromosomenaberrationen auftreten. Bei Verwendung von Tumormaterial hingegen tritt dieses Problem nicht auf. Ob HBV eine solche Translokation auslösen kann, ist nicht bekannt.

C. PROBLEMSTELLUNG

Da in HBV-positiven primären hepatozellulären Karzinomen nur chromosomal integrierte, nicht aber frei replizierende, HBV DNA vorhanden ist, muß man, um die molekularen Mechanismen der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese verstehen zu können, integrierte HBV DNA Sequenzen analysieren. Die bisher in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Hepatome und Hepatom-Zelllinien enthielten mehrere unabhängige HBV DNA Integrate. Damit war es schwierig zu entscheiden, welches dieser Integrate an der Tumorentwicklung beteiligt ist.

Aus diesem Grunde erschien es zweckmäßig, eine Hepatom-Zelllinie mit nur einem HBV DNA Integrat detailliert zu untersuchen und erneut folgende Fragen zu beantworten:

- Welche Struktur und Funktion hat die integrierte HBV DNA?
- Welche Funktionen üben die zur HBV DNA Sequenz benachbarten, humanen DNA Sequenzen aus?
- Besitzen diese humanen Sequenzen im Zusammenwirken mit dem HBV DNA Integrat onkogene Eigenschaften?
- Kann man die erhaltenen Daten einem der klassischen Mechanismen der viralen Onkogenese zuordnen?

Da zu Beginn dieser Dissertation ein cis-Effekt des HBV auf unmittelbar benachbarte, humane DNA Sequenzen in keinem der untersuchten Fälle nachgewiesen werden können, sollten cis-Einflüsse des HBV auf relativ entfernt liegende humane DNA Sequenzen untersucht werden. Dazu wurde das singuläre HBV DNA Integrat aus huH-4 Hepatomzellen in einem Cosmidvektor kloniert. Im Cosmid-system können große, flankierende humane DNA Abschnitte kloniert werden.

Zwischenzeitlich konnte in unserem Labor gezeigt werden, daß das HBx Genprodukt eine transaktivierende Funktion ausübt (Wollersheim, 1987; Zahm, 1987). In diesem Zusammenhang war von Interesse, ob auch integrierte HBV DNA Sequenzen diesen trans-Effekt zeigen. Dementsprechend wurde untersucht, ob diese transaktivierende Funktion im huH-4 HBV DNA Integrat konserviert ist und, wenn dies der Fall sein sollte, ob diese trans-Funktion tatsächlich vom HBx Gen abhängig ist.

D. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien

Agarose	Seakem ME
Ampicillin	Sigma
alpha (^{32}P -)dATP	Amersham
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Borsäure	Sigma
Caesiumchlorid	Biomol
Chloramphenicol	Sigma
^{14}C -Chloramphenicol	Amersham
alpha (^{32}P -)dCTP	Amersham
Dimethylformamid	Merck
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	Pharmacia
Didesoxyribonucleosidtriphosphate (ddNTPs)	Pharmacia
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Merck
Formamid	Merck
Geneticin	Gibco
Hefeextrakt	Difco
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Biomol
Phenol	Merck
Polyethylenglycol (PEG) 6000	Serva
Putrescin	Serva
Sarkosyl	Serva
Triton X-100	Serva
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-	
β -D-Galaktosid (Xgal)	Biomol

1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme

wurden von Biolabs, Boehringer, BRL, PL-Biochemicals oder Renner GmbH bezogen.

Weitere Enzyme

Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Boehringer
DNA Polymerase I	Biolabs
DNase I	Boehringer
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Merck
RNase A	Boehringer
T4 DNA Ligase	Boehringer
Trypsin	Seromed

1.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Mäuse

Bakterienstämme (E.coli)

490A	hsdR, hsdM, recA, gal, lac, pro, leu, rps1 (B. Habom)
BHB 2688	N205 recA (imm434, cIts, b2, red ⁻ , Eam, Sam) lambda (Hohn, 1979)
BHB 2690	N205 recA (imm434, cIts, b2, red ⁻ , Dam, Sam) lambda (Hohn, 1979)
C600	trp, thy, leu, his, recA (Appleyard, 1954)
JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lambda ⁻ , delta (lac-proAB), (F', traD36, proAB, lacIq, Zdelta M15) (Yanisch- Perron, 1985)

Zelllinien

CCL13	immortalisierte, nicht maligne Hepatozy- ten (Chang, 1954)
Fisher rat	Rattenfibroblasten-Zelllinie

HeLa	Epithelzellen aus humanem Cervixkarzinom (Gey, 1952)
HepG2	humane Hepatoblastoma-Zellen
Hep3B	humane, primäre Leberzellkarzinom-Zelllinie (Aden, 1979; Knowles, 1980; Twist, 1981)
huH-4	humane, primäre Leberzellkarzinom-Zelllinie (Huh, 1981)
Ltk	Mausfibroblasten (kit, 1963)
NIH 3T3	Mausfibroblasten (Aaronson, 1968)
PLC/PRF/5	humanes, primäres hepatozelluläres Karzinom (Alexander, 1976)

Mäuse

Balb c nu/nu Mäuse wurden von der Firma Iffa Credo (Frankreich) bezogen.

1.4 Medien und Puffer

LB Medium (ad 1l)	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
LB Platten	LB Medium mit 12 g/l Bactoagar
Xgal Indikatorplatten	LB Medium mit 12g/l Bactoagar, 1 mM IPTG und 30 mg/l Xgal (in DMF)
LBM Medium	LB Medium mit 10 mM $MgSO_4$
LBMM Medium	LBM Medium mit 0,2 % Maltose

Den Medien wurden, falls erforderlich, Ampicillin (100 µg/ml) oder Chloramphenicol (300 µg/ml) zugesetzt.

Medien für eukaryotische Zellen: DMEM (Biochrom)
FCS (Gibco)

PBS (ad 1 l)	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	$\text{Na}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
	0,2 g	KH_2PO_4
2 x HBS (ad 1 l)	8 g	NaCl
	0,36 g	KCl
	0,19 g	$\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	1 g	Glucose
	5 g	HEPES pH 7,12
Birnboim-Puffer:		
Lösung I	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
Lösung II	50 % (V/V)	0,4 M NaOH
	10 % (V/V)	SDS
Lösung III	60 % (V/V)	5M Kaliumacetat
	28,5 % (V/V)	H_2O bidest.
	11,5 % (V/V)	Eisessig
Ligase Puffer (10x)	12 mM	dATP
	500 mM	NaCl
	200 mM	Tris HCl pH 7,4
	50 mM	MgCl_2
NTE 150	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
NTE 650	650 mM	NaCl
	10 mM	Tris HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA

TE	10 mM	Tris HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
Phenol	TE Puffer gesättigtes Phenol (pH 8,0) mit 1 mg/ml 8-Hydroxychinolin	
Chloroform	Chloroform: Isoamylalkohol = 24 : 1	
Phenol/ Chloroform	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 25:24:1	

1.5 Plasmide

Onkogenplasmide

pSRA-2 (v-src)	Delorbe, 1980
pC14 (v-sis)	Gelmann, 1982
pFeSV (v-fes)	Sherr, 1980
pMCO (v-myc)	Dalla Favera, 1982
pki-ras640 (c-kiras)	McCoy, 1983
pfms (v-fms)	Donner, 1980
pABL-sub9 (v-abl)	Wang, 1983
pHax4 (v-myb)	Perbal, 1982
pYes (v-yes)	Kitamura, 1982
pHB11 (v-Haras)	Ellis, 1981
pH1 (v-Haras)	Ellis, 1980
pCMYC (c-myc)	Battey, 1983
pPim-1 (c-pim1)	Berns, 1984
pint-1 (c-int1)	Ooyen, 1984
pint-2 (c-int2)	Peters, 1983
p3611v-raf E-H (v-raf)	Rapp, 1983
pE ₃ D ₇ (c-erbB)	Vennstrom, 1982
pE ₂ A ₃ (c-erbA)	Jannson, 1983
pHuBlym-1 (c-Blym)	Cooper, 1983
pVfos (v-fos)	Verma, 1982
pBRFO4 (v-fps)	Hanafusa, 1980
pros-1 (v-ros)	Feldman, 1982

Sonstige

pUC19	Yanisch-Perron, 1985
pBR322	Bolivar, 1978
pAGO	Colbere-Garapin, 1979
pAG60	Colbere-Garapin, 1979
pB-8	Deininger, 1981
pSV2cat	Gorman, 1982
pcat2n	Gorman, 1982
pkkHBs	Wang, 1982
pHC79	Hohn, 1980
pSHH2.1	Will, 1985

2. METHODEN

2.1 DNA Isolation

2.1.1 Isolierung chromosomaler DNA (Perucho, 1981)

1-4 x 10⁷ Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 5 min bei 200 g pelletiert. Das Pellet wurde in 5 Volumina NTE 150 resuspendiert, die Suspension auf eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml Proteinase K und 0,4 % SDS eingestellt, 20 min bei 68°C und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens NTE 650 wurde die Lösung dreimal mit einem gleichen Volumen von Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min). Die DNA wurde aus der wäßrigen Phase mit 2 Volumina Ethanol abs. gefällt, das DNA-Knäuel in ein ERG überführt, zweimal mit 70 %igem Ethanol, einmal mit Ethanol abs. gewaschen und vakuumgetrocknet. Die hochmolekulare DNA wurde über Nacht in TE gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt (1 OD₂₆₀ entspricht ca. 50 µg DNA). Die DNA wird bei 4°C aufbewahrt.

2.1.2 Schnellpräparation von Cosmid- und Plasmid-DNA (Birnboim, 1979)

Die Präparation von Plasmid- und Cosmid-DNA verläuft prinzipiell gleich, da Cosmide lediglich große Plasmide darstellen.

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in einem ERG pelletiert (minifuge) und das pellet in 100 µl Lösung I re-

suspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurde, durch vorsichtiges Mischen, mit 200 µl Lösung II denaturiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde mit 150 µl Lösung III für etwa 60 min bei 0°C neutralisiert. Die Suspension wurde 10 min zentrifugiert und der Überstand zweimal phenolisiert. Die DNA wurde mit 2 Volumina Ethanol abs. aus dem phenolisierten Überstand präzipitiert, vakuumgetrocknet und in 50 µl TE Puffer (versetzt mit 20 µg/ml RNase A) gelöst. 10 µl waren für Restriktion und anschließende Gelelektrophorese ausreichend.

2.1.3 Präparative Isolierung von Cosmid- und Plamid-DNA

1 l LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit 1 ml einer plasmid- bzw. cosmidhaltigen Bakterien-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 - 0,6 inkubiert. Nach Zugabe von Chloramphenicol (Endkonzentration 150 - 300 µg/ml) wurde weitere 10 - 16 h amplifiziert. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (7000 rpm, GS3 Rotor, 10 min, 4°C) und das pellet in 40 ml NT-Puffer (50 mM NaCl/50 mM Tris HCl pH 8,0) resuspendiert, die Suspension mit 3 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 2,5 ml 20 % Triton X-100 und 5 g Lysozym versetzt. Nach 15 - 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die lysierten Bakterien abzentrifugiert (15000 rpm, GS3 Rotor, 60 min, 4°C), der Überstand auf eine 1,5 M NaCl Endkonzentration eingestellt und über Nacht bei 0°C mit einem 1/2 Volumen PEG 6000 präzipitiert. Die DNA wurde pelletiert (9000 rpm, GS3 Rotor, 20 min, 4°C), in 16 ml TE-Puffer (50 mM Tris HCl/20 mM EDTA/pH8,0) vorsichtig resuspendiert und etwa 1 h bei 37°C unter starkem Schütteln gelöst. Diese Lösung wurde mit 1 g CsCl/ml versetzt und in Beckman Type-50 "Quick Seal Tubes", die bereits 0,4 ml Ethio-

diumbromid-Lösung (10 mg/ml) enthielten, überführt. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation (36000 rpm, Ti50 Rotor, 60 h, 20°C) wurde die chromosomale DNA (obere Bande) von der Plasmid- bzw. Cosmid-DNA (untere Bande) separiert. Die untere Bande wurde abgenommen, das Ethidiumbromid mit H₂O-gesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt und die DNA Lösung in einen Dialyseschlauch überführt. Nach Dialyse gegen TE Puffer (mindestens 4 x 1h lang) wurde die Lösung einmal mit Phenol und zweimal mit CHCl₃ extrahiert. Die DNA wurde nach Zugabe von Ammoniumacetat (Endkonzentration: 2,5 M) mit 2 Volumina Ethanol abs. gefällt und in TE Puffer gelöst.

2.2 Restriktion von DNA

1-5 µg DNA wurden mit 2 µl der vom Hersteller empfohlenen 10 x Restriktionspuffer und der für einen Totalverdau notwendigen Restriktionsenzymmenge in einem Volumen von 20 µl 1-2 h bei 30°C, 37°C oder 65°C (je nach Enzym) inkubiert. Genomische DNA wurde bei einer Konzentration von 400 ng/µl mit bis zu 10 U Restriktionsenzym/µg verdaut. Bei einem Doppelverdau wurde die DNA zuerst mit dem Restriktionsenzym gespalten, dessen Inkubationspuffer die niedrigere Ionenstärke besitzt und dann für die zweite Restriktion die Ionenstärke durch Zugabe von NaCl Lösung erhöht.

2.3 Dephosphorylierung

Durch Hydrolyse der 5'-Phosphatgruppen durch alkalische Phosphatase wird ein restringierter Vektor vor Rückligation geschützt.

Die Dephosphorylierung wurde direkt nach der Restrik-

tion (s.2.2) im gleichen ERG durchgeführt. Die Inkubation wurde mit ca. 1 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestinal Phosphatase, CIP) bei 37°C für 30 min durchgeführt, danach das Enzym 10 min bei 68°C in Gegenwart von Nitriloessigsäure (Endkonzentration: 10 mM) inaktiviert. Anschließend wurde die DNA Ethanolgefällt und in TE gelöst.

2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung geschnittener und nativer DNA sowie als Kontrolle für die Ligation verwendet. Auf 0,4 - 2 % Agarosegelen lassen sich DNA Fragmente von 0,1 - 40 kb gut separieren. Als Längenstandards wurden ungeschnittene Lambda DNA (48,4 kb), HindIII verdaute Lambda DNA (23,7/9,5/6,7/4,5/2,3/2,0/0,56 und 0,1 kb), HindIII/EcoRI doppelrestringierte Lambda DNA (21,2/5,1/4,9/4,2/3,5/2,0/1,9/1,7/1,38/0,95/0,83 und 0,56 kb) sowie TagI geschnittene pBR322 DNA (1,4/1,3/0,47/0,37/0,315/0,313 und 0,141 kb) verwendet. Die Agarose wurde für 3 - 6 min in TAE Puffer aufgekocht, die Lösung nach Abkühlung auf ca. 50°C mit Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Nach etwa einstündigem Stehenlassen war das Gel vollständig polymerisiert. Die DNA Lösung wurde vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Auftragepuffer (50 % Sucrose; 10 mM EDTA; 3 M Harnstoff; 0,1 % Xylencyanol; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Orange G) gemischt. In der Regel wurden 10 - 20 µg zelluläre DNA bzw. 0,5 - 1 µg Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aufgetragen. Präparative Gele wurden bei 0°C und 1-2 V/cm über Nacht gefahren, analytische Gele liefen 15 - 18 h bei 40 V bzw. 4 - 5 h bei 100 V, Minigele wurden 1/2 - 1 h bei 80 V gefahren.

2.5 Elektroelution von DNA Fragmenten

Nach Auftrennung der DNA in präparativen Agarosegelen wurde die zu isolierende DNA Bande mittels der Längensstandards unter langwelligem UV Licht (302 nm) lokalisiert und mit dem Skalpell ausgeschnitten. Das so erhaltene Agarosegelstück wurde mit einem minimalen Volumen TAE Puffer luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch überführt und in eine mit TAE Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (parallel zu den Elektroden) gelegt. Die DNA wurde 2 - 4 h bei 100 V elektroeluiert. Um an der Dialysemembran haftende DNA freizusetzen, wurde für 30 sec, die Elektrodenpolung umgekehrt. Nach Entnahme der DNA Lösung aus dem Dialyseschlauch wurde 3 mal mit Phenol und 2 mal mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Die DNA wurde mit 5 M Ammoniumacetat (Endkonzentration: 2,5 M) Ethanol-gefällt und danach in TE gelöst.

2.6 Klonierung in Cosmiden

2.6.1 Partialverdau genomischer DNA und Größenfraktionierung

In ein ERG wurden 156 μl (= 100 μg) chromosomale huH-4 DNA, 24 μl 10 x Restriktionspuffer und 1,6 U Sau3A pipettiert. Der Restriktionsansatz wurde 25 min bei 37°C inkubiert, danach die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen im Auftragepuffer gestoppt und der Partialverdau auf einem 0,4 %igem Agarosegel im Kühlraum 36 h bei 2 V/cm aufgetrennt. Der DNA Bereich zwischen 30 und 45 kb wurde unter langwelligem UV Licht (302 nm) lokalisiert, mit dem Skalpell ausgeschnitten und elektroeluiert. Die DNA Lösung wurde auf eine Endkonzentration von 2,5 M Ammoniumacetat eingestellt, mit 2,5 Volumina Ethanol abs. präzipitiert und die DNA in TE gelöst. Die Aus-

beute an partialverdauter, chromosomaler DNA betrug 5 µg; dies entsprach 5 % der eingesetzten DNA Menge.

2.6.2 Ligation

2,7 µg partialverdaute, chromosomale DNA wurden mit 3,2 µg CIP behandelter, BamHI geschnittener Cosmid DNA (s.2.3) in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit 1,5 µl 10 x Ligase Puffer und 18 U T4 DNA Ligase bei 8°C über Nacht inkubiert. Das molare Verhältnis Vektor:Insert betrug dabei 5:1, die DNA Konzentration im Ligationsansatz 400 ng/µl.

2.6.3 Herstellung von Verpackungsextrakten

Aus den E.coli Stämmen BHB 2688 und BHB 2690, die in dem E- bzw. D-Kopfprotein defekte, lysogene Lambda-Phagen enthalten, wurden zwei einander komplementierende Verpackungsextrakte, das "Frier-Tau-Lysat" (Freeze Thaw Lysate, FTL) und das "Ultraschallextrakt" (Sonic Extract, SE), hergestellt (Hohn, 1979). Unter Verwendung einer Mischung dieser Enzymextrakte können DNA Konkatemere, die über jeweils durch ca. 40 kb getrennte cos Stellen (cohesive Enden) verfügen, in vitro in Lambdaphagenköpfe verpackt werden. Die so erhaltenen rekombinanten Phagen transportieren die rekombinante DNA mit hoher Effizienz in E.coli.

Der FTL Extrakt wurde wie folgt hergestellt:

Nach dem Testen der Temperatursensitivität von BHB 2688 bei 32°C und 42°C wurden 400 ml LB Medium mit ca. 5 Impfösen dieser Zellen angeimpft und bei der permissiven Temperatur (32°C) bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ inkubiert. Danach erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei

45°C, woraufhin die Kultur nochmals 3 h bei 37°C heftig geschüttelt wurde. Die Kultur wurde in Eiswasser abgekühlt, pelletiert (6500 rpm, GS3 Rotor, 10 min, 4°C) und das Pellet in 0,5 ml kaltem Puffer (10 % Saccharose/0,05 M Tris HCl pH 7,4) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl frisch hergestellter LysozymbLösung (2 mg/ml) wurde die Suspension kurz gemischt, danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C über Nacht aufbewahrt. Nach Auftauen der Suspension auf Eis wurden 125 µl M1 Puffer (2 % β -Mercaptoethanol/6mM Tris HCl pH 7,4/30mM Spermidin/30mM Putrescin/18mM $MgCl_2$ /15mM ATP) zugegeben und die Zelltrümmer abzentrifugiert (35000 rpm, Ti50 Rotor, 25 min, 4°C). Der Überstand wurde in ERGs aliquotisiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C gelagert.

Der SE Extrakt wurde wie folgt hergestellt:

E.coli BHB 2690 Zellen wurden kultiviert und der lytische Zyklus des Lambdaphagen induziert. Die Kultur wurde wie oben beschrieben sedimentiert, das Pellet in 3 ml Puffer A (20 mM Tris HCl pH 8,0/3 mM $MgCl_2$ /10 mM β -Mercaptoethanol/1 mM EDTA) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (15 min, pulsierend, 0°C) lysiert. Nach Zentrifugation (6000 rpm, SS34, 10 min, 4°C) wurde zum Überstand 0,6 ml M1 Puffer pipettiert und 20 µl Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.6.4 In vitro Verpackung und Plattierung

SE- und FTL-Verpackungsextrakte wurden auf Eis aufgetaut. Je 800 ng DNA des Ligationsansatzes wurden mit 2 µl SE 1 min durch langsames Verrühren mit einer Pipetenspitze gemischt, danach 10 µl FTL zugegeben, 1 min langsam verrührt und dann 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Verpackungsansatz wurde mit Phagenpuffer (10

mM Tris HCl pH 7,6/10 mM MgSO₄/1 mM EDTA) ad 1 ml verdünnt und mit 1 ml E.coli 490A Zellen (aus einer LBMM Kultur, OD₆₀₀ = 0,2) bei 37°C für 30 min inkubiert. Das Gemisch wurde auf einem 24 x 24 cm großen NC Filter ausplattiert und die ca. 60000 Bakterienkolonien etwa 7 h bei 37°C bis zu einer Größe von ca. 0,2 mm wachsen gelassen. Auf diese Weise wurden insgesamt 24 Ansätze verpackt und plattiert.

2.7 Subklonierung in Plasmiden

2.7.1 Ligation

Doppelrestringierte oder dephosphorylierte, einfach geschnittene Vektor DNA wurde mit dem zu klonierenden DNA Fragment im molaren Verhältnis von 1:1 in 1 x Ligations Puffer 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8°C mit 2 U T4 DNA Ligase/pmol DNA ligiert. Das Ligationsvolumen betrug 10 - 20 µl, die Ligationskonzentration 100 - 300 ng/µl.

2.7.2 Transformation von E.coli

Zunächst wurden kompetente E.coli Zellen (JM109, 490A) präpariert, welche in der Lage sind, fremde DNA aufzunehmen: in 500 ml antibiotikahaltigem LB Medium wurden E.coli Zellen bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 bei 37°C gezogen, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (7000 rpm, GS3 Rotor, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden in 250 ml eiskalter 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert, 45 min auf Eis stehengelassen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml der gleichen Lösung vorsichtig resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Aliquotisierung der Suspension in 15 % Glyzerin in 200 µl Portionen in

ERGs und Einfrieren der Ansätze in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und je 200 μl dieser Zellen zu der DNA des Ligationsansatzes (auf 100 μl mit bidest. Wasser aufgefüllt) pipettiert. Nach Inkubation auf Eis für 5 min und 5 min bei 37°C wurden die Transformationsansätze mit 700 μl LB für weitere 30 min bei 37°C leicht geschüttelt (80 rpm) und anschließend auf antibiotikahaltigen LB Agarplatten ausplattiert. Bei Klonierung in pUC19 wurden Xgal Indikatorplatten verwendet.

2.8 DNA Transfer auf Nitrozellulosefilter

Um spätere DNA-DNA Hybridisierungen durchführen zu können, muß zunächst die zu untersuchende DNA durch einen Southern Blot, Slot Blot bzw. Kolonieblot auf einen NC Filter überführt und durch "Backen" immobilisiert werden.

2.8.1 Kolonieblot

Eine berechnete Menge an zu erwartenden Bakterienkolonien wurde auf mit NC Filtern ("master") behafteten LB Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Aufpressen von angefeuchteten (kurz auf einer Agarplatte aufgelegten) NC Filtern auf den, von der Agaroberfläche abgezogenen, "master" NC Filter, mittels Glasplatten, wurden je zwei Replikafilter hergestellt. Die Replikafilter wurden danach einige Stunden auf Agarplatten bei 37°C inkubiert, um die Bakterienkolonien zu regenerieren. Die nachfolgenden Schrit-

te erfolgten entweder durch Auflegen der Replikafilter (Durchmesser: 8 cm) auf 2 ml Tropfen auf einer Haushaltsfolie oder bei den 24 x 24 cm Duplikatfiltern durch Auflegen auf 3 Lagen befeuchteten Whatman 3MM Papieren: die Bakterien wurden 7 min mit 0,5 M NaOH Lösung lysiert, 5 min mit 1 M Tris HCl pH 7,5 und 10 min mit 0,5 M Tris HCl pH 7,5/1,5 M NaCl neutralisiert. Am NC Filter haftende Bakterienreste wurden in 2 x SSC von Hand abgerieben, die Filter anschließend zweimal durch 2 x SSC gezogen, luftgetrocknet und 2 Stunden bei 80°C vakuumgetrocknet.

2.8.2 Slot Blot

Für Slot Blots wurde die Minifold II Apparatur (Schleicher & Schuell) verwendet.

5 - 15 µg DNA wurden in einem Volumen von bis zu 15 µl mit 3N NaOH Lösung (Endkonzentration: 0,3 N) 10 min bei Raumtemperatur denaturiert und danach auf Eis mit 4 M Natriumacetat-Lösung (Endkonzentration: 1 M) 10 - 60 min neutralisiert. Die Proben wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgetragen, der NC Filter luftgetrocknet und ca. 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.8.3 Southern Blot

Mit der Methode des Kapillar-Blottings (Southern, 1975) kann man das DNA-Bandenmuster einer Agarosegelelektrophorese auf einen NC Filter übertragen.

Die Positionen des Längenstandards wurden unter UV Licht durch Punktieren mit einer Pasteurpipette markiert. Die DNA im Gel wurde durch Säurebehandlung (2 x 15 min in 0,25 M HCl) partiell depurinert, anschlie-

Bend 2 x 20 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert und 2 x 20 min in 0,5 M Tris HCl pH 7,4/1,5 M NaCl neutralisiert. Das Gel wurde ca. 20 min in 20 x SSC leicht geschüttelt und anschließend umgekehrt auf einen mit 20 x SSC getränkten und mit 3 Lagen Whatman 3 MM Papier beschichteten Schwamm transferiert. Die DNA wurde mit 20 x SSC aus dem Gel auf den darüber gelegten NC Filter mittels einer mit 250 g beschwerten Schicht saugfähigen Papiers überführt. Dieser Transfer dauerte 12 - 20 h, wobei das Ansaugpapier mehrfach gewechselt wurde. Nach Übertragen der Bandenpositionen des Längenstandards durch Nadelstiche auf den NC Filter wurde dieser durch 2 x SSC gezogen, luftgetrocknet und danach 2 h bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.9 Nicktranslation

Mit Hilfe der Nicktranslation können DNA Moleküle radioaktiv markiert werden. Ein Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25 µl:

x µl DNA (= 100 ng)
 2,5 µl 10 x NT Puffer (0,5 M Tris HCl pH 7,5/0,1 M
 MgSO₄/10 mM DTT/500 µg/ml BSA)
 0,8 µl 1 mM dATP
 0,8 µl 1 mM dGTP
 0,8 µl 1 mM dTTP
 10 µl (= 100 µCi) alpha (³²P)-dCTP (3000 Ci/mmol)
 0,8 µl DNase I (10⁻⁵ mg/ml)
 2,4 µl (= 24 U) DNA Polymerase I
 y µl bidest. Wasser

Die Inkubation erfolgte 3 h bei 15°C. Der Ansatz wurde mit TE ad 100 µl verdünnt und nicht inkorporierte Ra-

dionukleotide über eine 20 cm lange, mit TE äquili-brierte Sephadex G50 Säule abgetrennt. Die im Aus-schlußvolumen laufende, markierte DNA wurde mittels ei-nes Handmonitors detektiert und 1 µl dieser DNA Lösung direkt mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Beckman Szintillationszähler gezählt. Die spezifische Aktivität der DNA Proben lag zwischen 10^8 - 3×10^9 cpm/µg DNA. Die auf der Säule befindlichen Radionukleo-tide wurden durch eine Spülung mit ca. 250 ml Äquili-brierungspuffer (TE) entfernt.

2.10 DNA-DNA Hybridisierung

Zwischen der nach dem Southern Blot, Slot Blot oder Ko-lonieblot entstandenen, einzelsträngigen DNA auf NC Filtern und einer dazu komplementären, einzelsträngi-gen, radioaktiv markierten DNA Probe können spezifische DNA-DNA Bindungen ausgebildet werden. Das Produkt einer solchen Reaktion ist autoradiographisch nachweisbar.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der zu hybridisierende NC Filter zunächst mit 5 x SSC/1 % Sarkosyl (für Blots mit Plasmid DNA) mindestens 1 h bei 68°C vorhybridisiert. Die Vorhybridisierung von Blots mit genomischer DNA erfolgte mit 5 x SSC/1 % Sar-kosyl/50 % Formamid für mindestens 3 h bei 42°C. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht mit 5 x SSC/1 % Sarkosyl (30 - 50 µl/cm² NC Filter) und 5×10^5 cpm nicktranslatierter DNA/ml (für Blots mit Plasmid DNA) bzw. bei 42°C über Nacht mit 5 x SSC/1 % Sarko-syl/50% Formamid/10 % Dextransulfat und 1×10^6 cpm nicktranslatierter DNA/ml (für genomische Blots). Die radioaktive DNA Probe wurde zuvor durch 5 minütiges Ko-chen auf dem Wasserbad denaturiert. Nach der Hybridi-sierung wurden die Filter solange mit 2 x SSC/0,5 % SDS

bei Raumtemperatur gewaschen bis die Radioaktivität in der Waschlösung unter 20 cpm lag (Kontaminationsmonitor: LB 1012 B, Berthold). Anschließend wurden die Filter 2 x 30 min unter stringenten Bedingungen mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 68°C gewaschen, luftgetrocknet und 30 min (Plasmid DNA) bis mehrere Tage (genomische DNA) bei - 80°C exponiert (mit einem Kodak XAR 5 Röntgenfilm). Die Hybridisierung gegen die Onkogene erfolgte je nach Stringenz mit 5 x SSC/1 % Sarkosyl und 40 % Formamid (myb), 45 % Formamid (src, yes, fms, abl, int 2, ros) bzw. 50 % Formamid (sis, fes, fms, Ha-ras, mos, raf, fps, ros, myc, Ki-ras, yes, pim 1, int 1, int 2, erb A, erb B, Blym, N-ras, N-myc) bei 42°C über Nacht. Bei Hybridisierung mit 40 % Formamid durfte lediglich mit 2 x SSC/0,5 % SDS bei 50°C gewaschen werden. Bei Hybridisierung mit 50 % (45 %) Formamid wurde schließlich mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS (0,5 x SSC/0,5 % SDS) bei 50°C gewaschen.

2.11 Plasmid DNA Sequenzierung

Ausgehend von einer bestimmten Restriktionsstelle wurde zur Bestimmung der Basenabfolge einer DNA Sequenz eine Variante der DNA Sequenzierungstechnik nach Sanger (1977) verwendet. Diese Technik wird in ihrer ursprünglichen Form auf einzelsträngige DNA angewendet. In der hier verwandten Variante kann Plasmid DNA in ihrer "supercoil" Form direkt sequenziert werden (Chen, 1985). Beide Verfahren beruhen auf dem gleichen Prinzip, nämlich der enzymatischen Synthese eines radioaktiv markierten, zu einem der beiden Plasmidstränge komplementären, Stranges.

Die doppelsträngige Plasmid DNA wird denaturiert (Schritt A), der entsprechende Primer an die einzel-

strängige DNA gebunden (Schritt B), die Sequenzierungsreaktion durchgeführt (Schritt C) und die vier Ansätze (A, G, C, T) nebeneinander auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Schritt D).

A. Denaturierung

2 µg Plasmid DNA wurden in 4 µl TE gelöst, 40 µl frisch hergestellte Denaturierungslösung (0,2 M NaOH/0,2 mM EDTA) dazupipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 2 M Ammoniumacetat pH 4,5 wurde die einzelsträngige DNA sofort mit 100 µl kaltem Ethanol abs. (-20°C) bei -80°C für 30 min präzipitiert, anschließend pelletiert (minifuge, 15 min, 4°C), mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und 5 min im Vakuum zur Trockne eingeengt.

B. Hybridisierung des "Primers" an die denaturierte DNA ("Annealing")

Nach der Alkalidenaturierung wurden zu der DNA folgende Lösungen pipettiert:

1 µl (=2,5 pmol) Primer ("17 mer M13 sequencing primer" (dGTAAAACGACGGCCAGT, Biolabs) oder "M13 reverse sequencing primer" (dAACAGCTATGACCATG, Boehringer))

1 µl 10 x Annealing Puffer (70 mM Tris HCl pH 7,5)

5 µl bidest. Wasser

3 µl alpha (³²P)-dATP (800 Ci/mmol)

Der Ansatz wurde 15 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert.

C. Sequenzierungsreaktion

Nach dem Annealing wurde 1 µl Klenow-Enzym (5 U) zugegeben, gemischt und jeweils 2,5 µl in vier verschiedene

ERGs, welche jeweils 2 µl des entsprechenden dNTP/ddNTP Sequenzierungsmixes (A, G, C, T) enthalten, an den Rand pipettiert.

Herstellung der Sequenzierungsmixe:

Nukleotid	A-Mix		C-Mix		G-Mix		T-Mix	
	µl	µM	µl	µM	µl	µM	µl	µM
dTTP	40	100	40	100	40	100	2	5
dCTP	40	100	4	10	40	100	40	100
dGTP	40	100	40	100	2	5	40	100
ddTTP							50	500
ddCTP			10	100				
ddGTP					12	120		
ddATP	10	100						
H ₂ O	50		86		86		48	

Nach Zugabe von 20 µl 10 x Annealing Puffer zu jedem Mix wurden diese in 2 µl Portionen aliquotisiert, eingefroren und entsprechend der bei der jeweiligen Sequenzierung benötigten Menge wieder aufgetaut.

Die Sequenzierungsreaktion wurde durch kurzes Abzentrifugieren gestartet und nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in jedes der vier ERGs 1,5 µl "Chase"-Lösung (125 µM dNTP) pipettiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 4 µl Probenpuffer (98 % deionisiertes Formamid/10mM EDTA pH 8,0/0,2 % Bromphenolblau/0,2 % Xylencyanol) gestoppt und das Wasser durch 15 minütige Lyophilisierung weitgehend entfernt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel durch Kochen für 4 min im Wasserbad denaturiert und anschließend sofort in flüssiger Luft abgeschreckt, um eine Renaturierung zu verhindern. Von jeder Probe wurden etwa 1 µl auf das Sequenzgel aufgetragen.

D. Sequenzgel

Nukleinsäuren, die sich nur um ein einziges Nukleotid voneinander unterscheiden, können auf sehr dünnen Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Sequenzgele wurden zwei 20 x 60 cm große Glasplatten verwendet. Die Glasplatte, auf der das Gel haften soll, wurde mit gamma-Methyloxypropyltrimethylsilan (Wacker Chemie) beschichtet, wodurch das Gel bei der Polymerisation kovalent an die Glasplatte gebunden wird. Dadurch kann das Gel auf der Platte getrocknet und anschließend autoradiographiert werden. Die andere Glasplatte, welche sich vom Gel lösen soll, wurde zur Erzeugung einer hydrophoben Oberfläche auf der Innenseite mit Dichlordimethylsilan behandelt.

Da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist, vergrößern sich die Abstände der einzelnen Banden zum unteren Ende des Gels hin immer mehr. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurden die Glasplatten durch keilförmige "Spacer" der Dicke 0,2 - 0,6 mm auseinander gehalten. Dadurch entsteht im Gel bei der Elektrophorese ein elektrischer Feldgradient, der von oben (Auftragsseite; dünner Gelteil) nach unten (dicker Teil des Geles) abnimmt. Auf diesen "Gradientengelen" verringert sich damit die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA Fragmente am unteren Ende des Gels immer mehr, wodurch die Abstände zwischen den einzelnen DNA Banden, die sich um nur 1 Nukleotid unterscheiden, über das gesamte Gel hin etwas gleichmäßiger werden. Zudem wird durch den Feldgradienten die Bandenbreite herabgesetzt, so daß auf einem Gel bis zu 350 Basen aufgelöst werden können.

Die zum Gießen des Geles verwendete Lösung bestand aus:

8 M Harnstoff

100 mM TBE Puffer (100 mM Tris HCl/83 mM Borsäure/1 mM EDTA)

5 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)

1 % Ammoniumperoxodisulfat

0,05 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Die Gellösung wurde nach dem Lösen des Harnstoffes durch ein Faltenfilter filtriert, die Polymerisation (nach Entgasung) durch 0,05 % TEMED initiiert und die Lösung auf die waagrecht liegende, silanisierte Glasplatte gegossen. Die zweite, silikonisierte Glasplatte wurde vorsichtig darüber geschoben und der Teflonkamm zur Ausbildung der Geltaschen eingesetzt. Nach etwa 1 h Polymerisationszeit wurden die Gele verwendet, wobei 100 mM TBE als Elektrodenpuffer diente. Um die Gele möglichst stark zu erwärmen, wurde eine Leistung von 60 Watt eingestellt, wodurch je nach Gelstärke eine Stromstärke von ca. 25 mA und eine Spannung von 2000 - 3000 V erreicht wurde. Dadurch konnte eine Oberflächentemperatur der Gele im sich am stärksten erwärmenden oberen Bereich von ca. 90°C erzielt werden, die durch eine auf einer der beiden Glasplatten montierten 3 mm dicken Aluminiumplatte gleichmäßig verteilt wurde. Das, aufgrund des unterschiedlichen Wärmeabflusses entstehende, sogenannte "smiling" der Banden unterblieb somit.

Zur Entfernung des Harnstoffes wurde die mit dem Gel behaftete Glasplatte ca. 30 min in 10 %iger Essigsäure inkubiert, danach 5 min unter fließendem Wasser abgespült, 2 h bei 80°C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend autoradiographiert.

2.12 Computerprogramme

Analysen (Restriktionskarten, Suche nach Expressionssignalen) und DNA Sequenzvergleiche wurden mit dem Betriebssystem VMS auf einem DEC MicroVax II Minicomputer mit Hilfe des Programmpaketes UWGCG (Devereux, 1984) durchgeführt.

2.13 Zellkultur

Eukaryontische Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 50 µg/ml Kanamycin supplementiert war. Im Falle der NIH 3T3 Zellen wurde 10 % hitzeinaktiviertes Serum von neugeborenen Kälbern (NCS) anstelle von FCS verwendet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit. Alle 2 - 3 Tage fand ein Mediumwechsel statt.

Die Zellpassagierung erfolgte durch Waschen der Zellen mit PBS und nachfolgende Inkubation mit 50 µl 0,25 % Trypsin/cm² bei 37°C, solange bis alle Zellen vom Flaschen- bzw. Petrischalen-Boden abgelöst waren (nach ca. 2 - 5 min). Nach Zugabe des entsprechenden Volumens an Medium konnten die Zellen auf einer größeren Oberfläche ausgesät werden oder zur Lagerung, in mit 10 % DMSO und 15 % FCS angereichertem DMEM, in flüssigem Stickstoff biologisch eingefroren werden.

2.14 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode (Graham, 1973).

5×10^5 - 1×10^6 Zellen wurden in einer 6 cm Petri-schale ausgesät und am nächsten Tag 2 - 3 h vor der Transfektion das Medium gewechselt. Ein Transfektionsansatz enthielt 20 µg Gesamt-DNA in einem Gesamtvolumen von 500 µl: genomische oder Plasmid- bzw. Cosmid-DNA, ultraschallbehandelte Kalbsthymus DNA (ad 20 µg), 25 µl 2,5 M CaCl_2 , bidest. Wasser (ad 250 µl); durch tropfenweises Zupipettieren von 250 µl 2 x HBS Puffer unter Mischen und nachfolgende 25 minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA präzipitiert. Das Gemisch wurde daraufhin auf die Zellen geträufelt. 16 - 18 h nach Transfektion wurden die Zellen 3 - 4 mal mit PBS gewaschen, um das DNA Präzipitat zu entfernen.

17 Tage nach der Transfektion waren NIH 3T3 Foci sichtbar. Die Selektion auf tk-positive Klone mit HAT Medium im Falle der Ltk Zellen bzw. die Selektion auf Genetecin-resistente Kolonien mit G418 enthaltendem Medium (500 µg/ml) im Falle der NIH 3T3, Fisher rat und HepG2 Zellen setzte 36 - 48 h nach der Transfektion ein. Ltk⁺-Kolonien wurden 14 - 17 Tage, G418 resistente 3T3-, Fisher rat- und HepG2-Kolonien 21 - 23 Tage nach der Transfektion mit Klonierungszylindern isoliert, zuerst in Costar-Platten, dann in kleinen Kulturflaschen und schließlich als Massenkulturen gezogen.

2.15 Radioimmunassay für HBsAg und HBe/eAg

HBsAg und HBe/eAg wurden aus Zellüberständen oder Mausseren mit den AUSRIA-Tests (Abbott) nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

2.16 CAT Aktivitätstest

Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit PBS gewaschen, mit einem Gummischaber abgeerntet und nach dem Überführen in ein ERG pelletiert (minifuge, 2 min). Das Pellet wurde in 80 µl 250 mM Tris HCl pH 7,8 resuspendiert, mit einem "Bradson Sonifier" (Mikrotip, 60 % Duty Cycle, 5 Impulse, 0°C) beschallt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (minifuge, 12 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 80 µl 250 mM Tris HCl pH 7,8, 4 µl ^{14}C -Chloramphenicol und 20 µl 10 mM Acetyl-Coenzym A 4 h bei 37°C inkubiert. Das Chloramphenicol und seine acetylierten Derivate wurden mit 1 ml Essigsäureethylester extrahiert und die organische Phase in einer Vakuumzentrifuge 45 min bis zur Trockne eingengt. Nach der Aufnahme des Rückstandes in 10 µl Essigsäureethylester und Auftragung auf eine Dünnschichtchromatographie (DC) Platte wurden das Chloramphenicol und seine acetylierten Derivate 70 min in 200 ml Laufmittel ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 95:5$) aufgetrennt. Die DC Platte wurde luftgetrocknet und 14 - 16 h bei - 80°C exponiert.

Der CAT Assay wurde wie folgt ausgewertet:

Zur Berechnung des prozentualen Anteils acetylierten Chloramphenicols in der Gesamtmenge wurden die entsprechenden Areale auf der DC Platte ausgeschnitten und im Szintillationszähler ausgezählt. Der Transaktivierungsfaktor wurde als die prozentuale Acetylierung des Chloramphenicols nach Kotransfektion des transaktivierenden Plasmids (Testplasmid) mit dem CAT Plasmid (Indikatorplasmid), bezogen auf die prozentuale Acetylierung nach der Transfektion des Indikatorplasmids alleine, ausgedrückt.

2.17 Inokulation von Mäusen

In 6 Wochen alte männliche Balb c nu/nu Mäuse wurden 2×10^7 Zellen des NIH 3T3 1/6 Zellklones subkutan in den Rücken inokuliert.

E. ERGEBNISSE

1. Nachweis einer chromosomal integrierten HBV DNA Sequenz im Genom der humanen Hepatom-Zelllinie huH-4

Die Etablierung der Zelllinie erfolgte aus einer Biopsie des primären Leberzellkarzinoms (PLC) eines 51jährigen Japaners (Huh, 1981). Aus der Literatur war nicht bekannt, ob diese Zelllinie integrierte HBV DNA Sequenzen enthält. Um die Anzahl und den Charakter der HBV Integrate zu bestimmen wurde eine Southern Analyse der huH-4 Zelllinie durchgeführt.

Zur Charakterisierung der integrierten, viralen DNA wurden die Restriktionsenzyme ClaI, HindIII und EcoRI verwendet. ClaI und HindIII schneiden in den publizierten HBV Genomen (Ono, 1983; Fujiyama, 1983; Pasek, 1979; Valenzuela, 1980) nicht, wohingegen EcoRI in allen HBV Subtypen, außer dem Subtyp adr, eine Schnittstelle besitzt. Da die huH-4 Zelllinie japanischer Herkunft ist und der HBV Subtyp adr in Asien zu über 90 % vorkommt, wurde davon ausgegangen, daß auch EcoRI die integrierte, virale DNA nicht restringiert. Demnach stellt jede Bande die nach Restriktion der genomischen DNA mit den obengenannten Enzymen, mit einer ³²P-markierten, klonierten HBV DNA (s. D.2.9) hybridisiert ein HBV Integrat dar. Jedes so erhaltene HBV Integrat enthält virale DNA, die auf beiden Seiten von humanen DNA Sequenzen flankiert ist.

Die Southern Analyse (Abb. 4B) zeigt, daß nach Spaltung der huH-4 DNA jeweils nur eine HBV DNA hybridisierende Bande auftritt: eine 20 kb ClaI Bande, eine 10 kb EcoRI Bande und eine 11 kb HindIII Bande. Die huH-4 Zelllinie enthält folglich ein singuläres HBV DNA Integrat. Die Charakterisierung dieses Integrates soll Erkenntnisse über den Mechanismus der malignen Transformation von

Hepatozyten liefern.

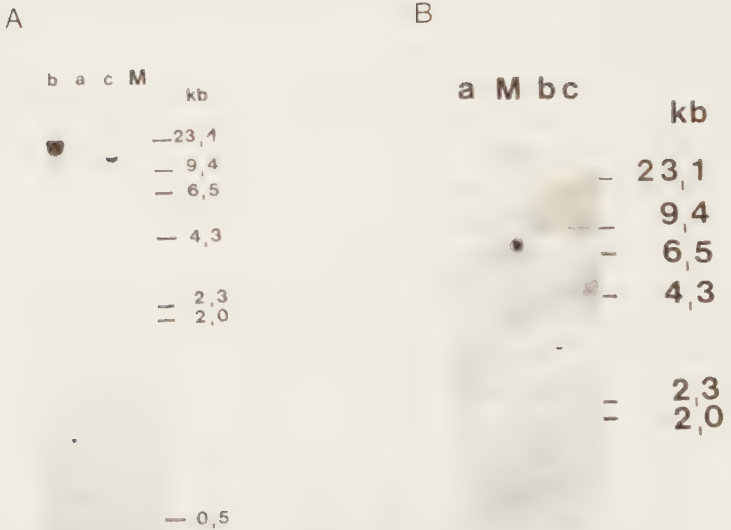


Abb. 4: Southern Analyse der huH-4 DNA

DNA aus huH-4 Zellen wurde mit ClaI (A, B, Spur a), EcoRI (B, Spur c) und HindIII (B, Spur b), DNA aus PLC/PRF/5 Zellen mit HindIII (A, Spur b) und DNA aus Hep3B Zellen ebenfalls mit HindIII (A, Spur c) geschnitten, auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt (s. D 2.4), auf NC Filter übertragen (s. D 2.8.3) und mit 32 P-HBV DNA (s. D 2.9) hybridisiert. Die Bandenpositionen (in kb) des Lambdamarkers (A, B, Spur M) sind jeweils rechts im Bild angegeben.

Ferner sollte abgeschätzt werden, ob jede Hepatomzelle der huH-4 Zelllinie eine integrierte HBV Kopie beinhaltet oder, ob diese Zelllinie auch Hepatomzellen ohne das HBV Integrat enthält. Dies ist wichtig zu wissen für die Berechnung der Anzahl der Kolonien die getestet werden müssen um einen HBV spezifischen Klon zu erhalten (siehe 2.1).

Von der PLC/PRF/5 Zelllinie (Edman, 1980) und der Hep3B Zelllinie (Twist, 1981) war bekannt, daß jede Zelle je eine Kopie ihrer integrierten HBV DNA Sequenzen enthält. Diese Zelllinien wurden deshalb in der Southern Analyse (Abb. 4A) als interner Standard verwendet. Die Intensität des Hybridisierungssignales der 20 kb ClaI huH-4 DNA Bande wurde als ca. fünfmal schwächer geschätzt als die Intensitäten der Hybridisierungssignale der 18 kb HindIII Hep3B Bande und der 18 kb HindIII PLC/PRF/5 DNA Bande. Unter dieser Annahme enthält nur jede ca. fünfte huH-4 Zelle eine Kopie des HBV Integrates. Dieser Sachverhalt wird später erörtert (siehe 2.2).

2. Klonierung des HBV DNA Integrates

Das Ziel ist es, cis- und trans-Effekte des HBV zu untersuchen. Dazu muß die Struktur der viralen DNA und flankierender humaner DNA Sequenzen analysiert werden. Es müssen daher Fragmente, die virale und humane DNA enthalten mengenmäßig angereichert, d.h. kloniert werden. Da diese Fragmente das von beiden Seiten mit humanen Sequenzen umgebene HBV Integrat enthalten sollen, dürften für die Klonierung über einen Totalverdau der genomischen DNA nur Restriktionsenzyme eingesetzt werden die nicht in der integrierten HBV DNA Sequenz schneiden. Es bestünde trotzdem die Gefahr daß, durch

eine Punktmutation, eine Deletion oder ein Rearrangement Restriktionsstellen in dem HBV Integrat entstanden sind, die im HBV Genom bisher nicht beobachtet wurden. Somit könnten Enzyme wie HindIII, die im HBV Genom nicht schneiden, bei einem Totalverdau der genomischen DNA die integrierte HBV DNA doch schneiden. Dabei könnten auch kleine DNA Fragmente entstehen die in der Southern Analyse nicht nachzuweisen sind. Um zu vermeiden, daß man ausschließlich HBV DNA Fragmente enthält die auf nur einer Seite von humaner DNA flankiert sind, wurde ein Partialverdau der huH-4 DNA mit Sau3A durchgeführt. Auf diese Weise können überlappende DNA Fragmente isoliert werden.

Als Klonierungsvektor wurde ein Cosmid (Hohn, 1980) eingesetzt. Cosmide sind Plasmide, die neben den für ihre Replikation notwendigen Elementen noch die cos (cohesive) Stellen aus dem Lambdaphagen tragen. Diese cos Stellen erlauben die in vitro Verpackung der Cosmide in Lambdaphagenköpfe. Ein Vorteil der Cosmide gegenüber dem Lambdasystem ist, daß bis zu 45 kb große Fragmente klonierbar sind. Dies war somit die Methode der Wahl, um cis-Effekte des HBV über längere Distanzen zellulärer DNA zu untersuchen. Weitere Vorteile der Cosmide gegenüber den Lambdaphagen sind:

- 1) es entstehen nur Hybridklone, so daß keine spätere Selektion für die rekombinante DNA nötig ist;
- 2) Cosmide eignen sich ausgezeichnet zum "Chromosome walking";
- 3) es müssen weniger Klone getestet werden, um das gewünschte Gen zu isolieren;
- 4) die DNA-Ausbeute aus einer Kultur eines rekombinanten Cosmids ist höher als die DNA-Ausbeute aus einem Phagenlysat.

Ein Nachteil der Cosmidklonierung ist die im Vergleich zur Lambdaklonierung geringere Effizienz, da sich bei der Klonierung in Cosmiden 10 bis 100 mal weniger Klone isolieren lassen als bei einer Lambdaklonierung.

2.1 Strategie der Klonierung im Cosmidssystem

Zur Klonierung des HBV DNA Integrates wurde die Methode von Meyerowitz et al. (1980) optimiert. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 5 wiedergegeben.

Als Vektor wurde das 6,4 kb große Cosmid pHC79 (Hohn, 1980) gewählt. Dieser Vektor hat eine Aufnahmekapazität von 32 - 44 kb an fremder DNA. pHC79 wurde durch BamHI linearisiert und danach mit alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung wird die Rückligation und die Konkatemerbildung von Cosmidmolekülen untereinander erheblich reduziert.

Chromosomale DNA mit einem MG von größer 150 kb wurde aus der huH-4 Zelllinie präpariert und mit Sau3A partiellverdaut. Dieses Enzym besitzt eine 4 bp Erkennungsstelle und schneidet in der genomischen DNA statistisch alle 256 bp. Zu beachten ist allerdings auch, daß Sau3A in der HBV Sequenz schneidet. Die Anzahl der Sau3A Schnittstellen in den publizierten HBV Genomen variiert, abhängig vom HBV Subtyp zwischen 6 und 18. Der Partialverdau wird so eingestellt, daß vorwiegend 30 - 45 kb Fragmente entstehen. Nach Auftrennung der Fragmente des Partialverdaus über ein 0,4%iges Agarosegel werden die 30 - 45 kb Moleküle, nach Ausschneiden des entsprechenden Gelstückes mit dem Skalpell, aus dem Gel eluiert. Moleküle dieser Größe sind, falls sie zusammenligiert werden sollten, zu groß und können daher nicht mehr verpackt werden. Dadurch werden Klonierungsartefakte, durch Ligation von auf den Chromosomen nicht benachbarten DNA Fragmenten, vermieden.

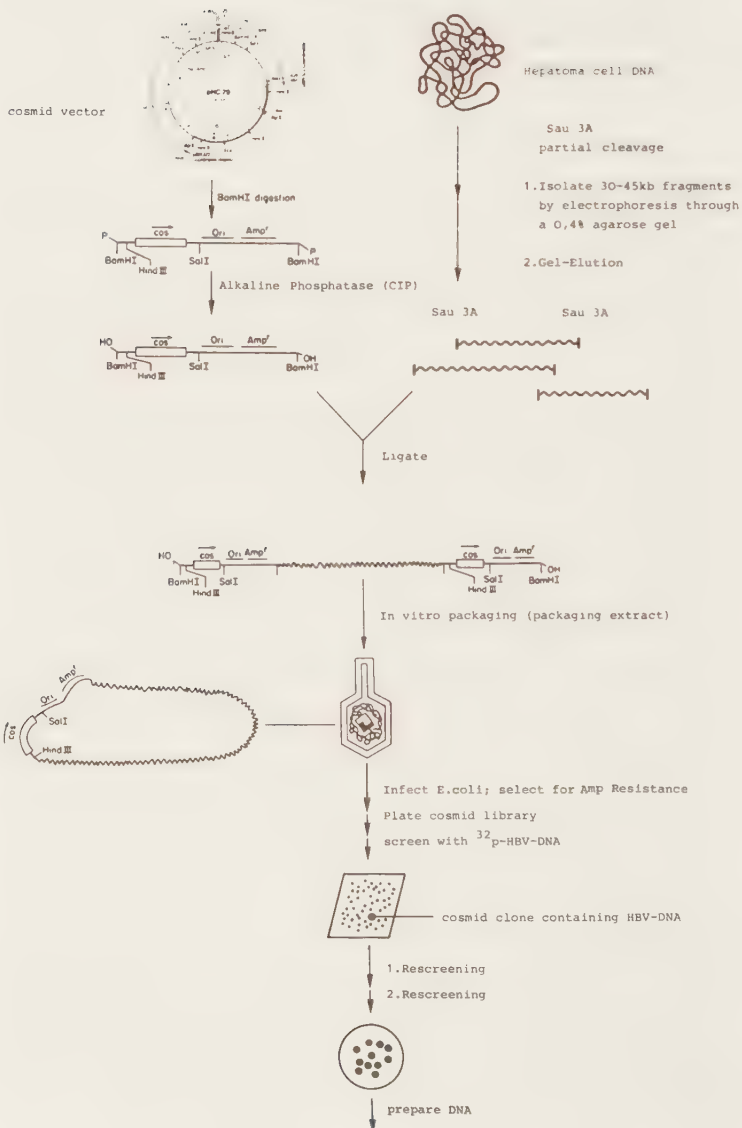


Abb. 5: Strategie der Cosmidklonierung

Genomische DNA wird mit Sau3A partialverdaut, die entstandenen Fragmente werden auf einem Agarosegel separiert und die 30 - 45 kb Moleküle werden schließlich aus dem Gel eluiert. Diese Fragmente werden mit dem BamHI geschnittenen und mit CIP dephosphorylierten Cosmidvektor pHC79 ligiert. Nach in vitro Verpackung der Konkatemere werden E.coli 490A infiziert und HBV DNA enthaltende Cosmidklone durch Koloniehybridisierung "gefischt". Die so erhaltenen Klone werden durch zweimalige Selektion mit Hilfe der HBV DNA Hybridisierungsprobe aufgereinigt.

Der BamHI geschnittene, dephosphorylierte Vektor wird mit den BamHI kompatiblen, 30 - 45 kb Sau3A DNA Fragmenten ligiert. Das Konzentrationsverhältnis muß dabei so gewählt werden, daß eine intermolekulare Konkatemerbildung zwischen Vektormolekülen und humaner DNA stattfindet. Bei zu niedriger Konzentration entstehen durch Ringschluß vorwiegend, für die Klonierung wertlose, zyklische Monomere.

Der Ligationsansatz wird in vitro verpackt und E.coli 490A Zellen werden infiziert.

Das Wirtsbakterium E.coli 490A besitzt kein intaktes DNA Reparatursystem mehr, da das für die Rekombination notwendige *recA* Gen mutiert ist. Diese Mutation wurde durch Sensitivität gegen die DNA schädigende Wirkung von UV-Licht überprüft. In Abhängigkeit der Dosis an UV-Licht überleben die Zellen mit einer *recA* Mutation die Bestrahlung kürzer als Wildtypzellen. Zur erfolgreichen Klonierung eukaryotischer DNA ist weiterhin von Bedeutung, daß der Wirtsstamm keine Restriktionsendonukleasen besitzt, welche die zu klonierende DNA abbauen würde (siehe 2.2).

Die Anzahl der Kolonien die getestet werden müssen, um einen HBV DNA positiven Klon zu finden, läßt sich mit der folgenden Formel (Clarke & Corbon, 1978) berechnen:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f) \quad \text{wobei}$$

N = Anzahl der Rekombinanten

P = Wahrscheinlichkeit

f = Bruchteil des klonierten Genoms in einem rekombinanten Klon, bezogen auf ein menschliches Genom.

Das humane Genom besitzt eine Komplexität von ca. 3×10^9 bp. Um mit 99%iger Wahrscheinlichkeit ($P = 0,99$) einen HBV DNA positiven Klon in einer Genbank von durchschnittlich 42 kb Fragmenten eines menschlichen Genoms zu finden müßte man ca. $3,5 \times 10^5$ Kolonien testen. Unter der Annahme aber, daß nur jede ca. fünfte huH-4 Zelle eine Kopie des HBV DNA Integrates enthält (siehe 1.) müßte man bis zu ca. $1,5 \times 10^6$ Kolonien "austesten", um mit Sicherheit einen Klon zu erhalten der die integrierte HBV DNA Sequenz enthält.

2.2 Klonierung

Um die Qualität der zur Klonierung des HBV DNA Integrates einzusetzenden Vektor DNA zu überprüfen, wurde:

- a) die Effizienz der Phosphatase Behandlung des Cosmids durch Vergleich der Rückligation des BamHI geschnittenen, dephosphorylierten Vektors mit der des BamHI geschnittenen, nicht dephosphorylierten Cosmids getestet (Tab. 1). Die Rückligation war nach Phosphatase Behandlung tausendfach erniedrigt;
- b) die Intaktheit, d.h. Ligierbarkeit der BamHI Enden des Vektors wurde durch Testligation mit BamHI verdauter Lambda DNA geprüft (Tab. 1). Das Ergebnis entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten

und zeigt, daß die BamHI "sticky ends" nicht durch unspezifische Exonukleasen verdaut waren.

Tabelle 1: Ligationseffizienzen des Vektors

Cosmid DNA	Amp ^r Kolonien/ μ g
BamHI verdaut und religiert	$3,3 \times 10^4$
BamHI verdaut, dephosphoryliert und rückligiert	30
BamHI verdaut, dephosphoryliert und mit BamHI verdauter Lambda DNA religiert	$2,2 \times 10^3$

Um die optimalen Bedingungen für den Partialverdau auszutesten wurde, in einem Vorversuch, mit 5 μ g huH-4 DNA eine Zeitkinetik bei einer konstanten Enzymkonzentration von 0,08 U durchgeführt. Dazu wurde dem Restriktionsansatz ein Aliquot (200 ng) nach 0, 10, 15, 20, 25, 28, 31 und 34 min entnommen, die Reaktion durch 10minütiges Erhitzen im Auftragepuffer gestoppt und die entstandenen Fragmente auf einem 0,4%igem Agarosegel aufgetrennt. Als Kriterium für eine optimale Verdauezeit zur Isolierung von 30 - 45 kb großen DNA Fragmenten wurde das Verschwinden der auf dem Gel als obere Bande sichtbaren chromosomalen DNA gewertet. Dieses Kriterium war nach 25 min erfüllt. Die Größenselektion sollte 25 kb nicht unterschreiten, da bereits bei Ligation von zwei Molekülen einer Größe von ca. 20 kb Klonierungsartefakte auftreten können. Der präparative Partialverdau von 100 μ g huH-4 DNA erfolgte unter den beschriebenen Bedingungen des Vorversuchs. Die Auftrennung über ein 0,4 %iges präparatives Agarosegel wurde im Kühlraum bei 2 V/cm durchgeführt. Anschließend wurde der Bereich

zwischen ca. 25 - 45 kb mit dem Skalpell ausgeschnitten und elektroeluiert (s. D.2.5). Die so erhaltene DNA Fraktion wurde durch intermolekulare Konkatemerbildung bzw. Rückligation in einem Vorversuch auf die Intaktheit ihrer Sau3A Enden getestet. Dies wurde durch das Verschwinden der entsprechenden 25 - 45 kb Bande auf einem 0,4 %igen Agarosegel angezeigt.

In einer Testligation wurde der so geprüfte Vektor und die getestete 25 - 45 kb Insert-Fraktion, bei einer Gesamt-DNA Konzentration von 400 ng/ μ l, in unterschiedlichem molarem Verhältnis ligiert. Ein Aliquot der Ligationsansätze (800 ng) wurde mit selbst hergestellten Verpackungsextrakten in vitro verpackt (s. D.2.6.4) und auf dem Indikatorstamm 490 A ausplattiert (Tab. 2). Bei einem Vektor/Insert Ligationsverhältnis von 5:1 wurde der höchste Titer, nämlich $5,6 \times 10^5$ Kolonien/ μ g Insert erzielt. Dieses Ergebnis liegt um eine 10er Potenz über den in der Literatur beschriebenen Verpackungseffizienzen.

Tabelle 2: Verpackungseffizienzen der mit huH-4 DNA ligierten Cosmid DNA

Ligationsverhältnis Vektor : Insert	Amp ^r Kolonien / μ g Insert DNA
5 : 1	$5,6 \times 10^5$
10 : 1	$3,8 \times 10^5$
15 : 1	$2,0 \times 10^5$
20 : 1	$1,3 \times 10^5$

Das Ligationsverhältnis von 5:1 wurde nicht unterschritten, da die Wahrscheinlichkeit einer Ligation von zwei, ca. 20 kb großen Insertmolekülen, die u.U. doch im Pool der 25 - 45 kb Fraktion enthalten sein könnten, mit abnehmenden Vektor/Insert Ligationsverhältnis zunimmt.

Plattierung auf E.coli C600 reduzierte den Titer durchschnittlich um den Faktor 3. Dies steht im Einklang damit, daß der Wirtsstamm C600, im Gegensatz zu E.coli 490A, Endonukleasen enthält, welche die Cosmid DNA abbauen können. Ferner wurde eine zweifache Reduzierung der Verpackungseffizienzen bei der doppelten Gesamt-DNA Menge (1,6 µg) im Verpackungsansatz beobachtet.

In einem präparativen Ligationsansatz wurde unter den Bedingungen des soeben beschriebenen Vorversuches, bei einem Vektor/Insert Verhältnis von 5:1, 1 µg Insert und 2,3 µg der CIP behandelten Cosmid DNA eingesetzt. Um mit hoher Sicherheit mindestens einen HBV DNA enthaltenden Klon detektieren zu können, müssen aus statistischen Gründen ca. $1,5 \times 10^6$ Kolonien durch Koloniehybridisierung mit ^{32}P -markierter HBV DNA getestet werden (siehe 2.1). Aufgrund der limitierten Menge an Insert DNA wurden zur in vitro Verpackung des Ligationsansatzes kommerziell erhältliche Extrakte mit einer, verglichen mit den selbst hergestellten Verpackungsextrakten, dreifach erhöhten Verpackungseffizienz verwendet. Man würde somit einen Titer von ca. $1,7 \times 10^6$ Kolonien/µg Insert DNA erwarten. Tatsächlich wurde eine Verpackungseffizienz von $2,3 \times 10^6$ Kolonien/µg Insert DNA erzielt. Insgesamt wurden ca. $1,4 \times 10^6$ Kolonien auf 24 20 x 20 cm NC Filter ausplattiert, von jedem dieser sog. "master" NC Filter zwei Duplikat-NC Filter angefertigt und diese mit ^{32}P -markierter HBV DNA hybridisiert. Schwärzungen auf den Autoradiographien der zwei, zu einem "master" Filter gehörenden, Duplikat NC

Filter galten nur dann als positiv, wenn sie auf beiden Autoradiographien an der gleichen Stelle auftraten. So wurden zwei HBV-positive Kolonien entdeckt, was gut mit der vorher durchgeführten Kalkulation übereinstimmte. Diese wurden durch zweimalige Selektion mit Hilfe der HBV-Hybridisierungsprobe aufgereinigt. Dazu wurden die, den Schwärzungen auf den Autoradiographien entsprechenden Areale auf dem "master" NC Filter mit dem Skalpell ausgeschnitten, die darauf befindlichen Kolonien verdünnt, ausplattiert und erneut mit der ^{32}P -markierten HBV Probe hybridisiert. Die beiden HBV spezifischen Kolonien konnten dabei reidentifiziert werden. Eine nochmalige Koloniehybridisierung der isolierten, HBV positiven Kolonien führte dann zur Isolation der reinen, HBV DNA enthaltenden Klone. Im Folgenden wurde aus den als huH-4/3 und huH-4/9 bezeichneten Cosmidklonen DNA präpariert. Die Inserts von huH-4/3 bzw. huH-4/9 lassen sich leider nicht aus den Klonen herausschneiden, da durch Ligation der Sau3A Insertfragmente in die kompatible BamHI Schnittstelle des Cosmidvektors die BamHI Schnittstelle zerstört wurde.

Eine Southern Blot Hybridisierung von huH-4/3 bzw. huH-4/9 mit ^{32}P -markierter HBV DNA (Abb. 6) bestätigte, daß diese Klone tatsächlich HBV Sequenzen enthalten. Wie aus einem Vergleich der Gelbilder mit den entsprechenden Autoradiographien hervorgeht, haben die Cosmidklone huH-4/3 und huH-4/9 unterschiedliche Enzymspaltungsmuster und enthalten verschiedene HBV spezifische Fragmente (Tab. 3). Da die huH-4 Zelllinie nur ein HBV DNA Integrat enthält, muß es sich bei huH-4/3 und huH-4/9 um zwei verschiedene, aber zumindest im HBV Bereich überlappende Klone handeln.

Tabelle 3: HBV spezifische DNA Fragmente

	huH-4/3	huH-4/9
EcoRI	9,8 kb	8,8 kb
HindIII	11,5 kb	10,0 kb
PstI	7,0 kb	6,6 kb

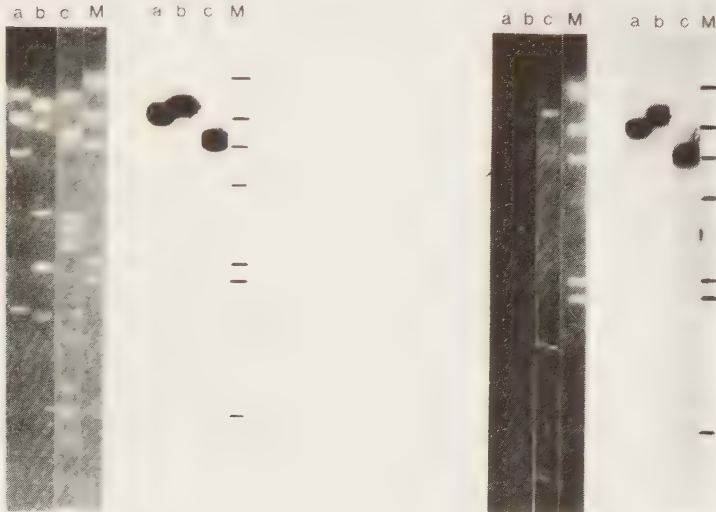


Abb. 6: Southern Blothybridisierung von huH-4/3 und huH-4/9 mit ^{32}P -markierter HBV DNA

DNA des Cosmidklones huH-4/3 bzw. huH-4/9 wurde mit EcoRI (a), HindIII (b) und PstI (c) verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt, auf NC-Filter transferiert und mit ^{32}P -HBV DNA hybridisiert. Die Größen (kb) der HBV spezifischen Fragmente sind in Tab. 3 wiedergegeben. Als Größenmarker (M) wurde HindIII restringierte Lambda DNA verwendet.

3. Charakterisierung der Klone

Im weiteren Verlauf sollen die aus der huH-4 Genbank isolierten Cosmidklone huH-4/3 und huH-4/9 charakterisiert werden. Dazu sollen ihre strukturellen und biologischen Eigenschaften analysiert werden. Ziel dieser Untersuchungen ist, den Mechanismus der malignen Transformation verstehen zu lernen.

3.1 Restriktionskartierung der Klone

Durch eine grobe Restriktionskartierung sollen zunächst die Größe, die Lage der HBV DNA und der Überlappungsgrad der Cosmidklone huH-4/3 und huH-4/9 bestimmt werden. Dem Leser soll die mehrere Seiten füllende, detaillierte Darlegung der Gedankengänge die zum Erstellen der Restriktionskarten führten erspart bleiben. Im Prinzip wird zur Erstellung einer preliminären Genkarte die Cosmid DNA zuerst mit Restriktionsnukleasen, die vergleichsweise nur wenige Schnittstellen erzeugen, gespalten. Je mehr DNA Fragmente entstehen, desto komplizierter wird es nämlich ihre Reihenfolge und gegenseitige Orientierung festzulegen. Bei Annahme einer DNA Zusammensetzung von 50 % A-T und 50 % G-C-Basenpaaren schneidet ein Enzym das eine 4 bp-Sequenz erkennt im Durchschnitt alle 256 bp, ein 6 bp erkennendes Restriktionsenzym dagegen alle 4096 bp. Eine Hexanukleotidsequenz, die nur 2 der 4 Basen enthält wird durchschnittlich nur alle 65536 bp geschnitten. Die Cosmidklone werden, aufgrund ihrer Größe, folglich nur mit 6 bp erkennenden Restriktionsenzymen gespalten. Ferner sollten die zu verwendeten Enzyme die HBV Sequenzen der Klone huH-4/3 bzw. huH-4/9 maximal zweimal schneiden, um die Anzahl der Fragmente eines Verdaus nicht zu stark zu erhöhen. Zur Kalkulation wurde die Anzahl der jeweili-

gen Enzymschnittstellen der bereits publizierten HBV Nukleotidsequenzen zu Grunde gelegt. Die DNA Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, anschließend durch einen "Southern Transfer" auf einen NC Filter immobilisiert und mit ^{32}P -markierter HBV DNA hybridisiert. Als weiterer Fixpunkt zur Erstellung der physikalischen Genkarten wurde der Cosmidvektoranteil von huH-4/3 bzw. huH-4/9 (siehe 2.2) verwendet, womit die Festlegung der Orientierung der DNA Fragmente zueinander erleichtert wird. Deshalb wurde simultan zur HBV Hybridisierung eine Hybridisierung mit ^{32}P -markierter pHC79 DNA durchgeführt. Durch Kombination von Einzel- und Doppelverdaus mit den jeweiligen Enzymen können dann aus den verschiedenen Spaltmustern und den Hybridisierungssignalen, mit Hilfe eines Computerprogramms zur Längenbestimmung der DNA Fragmente, die Restriktionsstellen und die Lage der HBV DNA in huH-4/3 bzw. huH-4/9 bestimmt werden. Der kritische Punkt bei der Erstellung der Karten ist die Größenbestimmung der Fragmente, weswegen die Verdaus jeweils auf zwei Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration aufgetrennt wurden. Ein 1,5%iges Agarosegel zur Größenbestimmung der Fragmente zwischen 2 und 20 kb und ein 0,6%iges Agarosegel zur Bestimmung von Fragmentlängen zwischen 0,2 und 2 kb.

Die Restriktionskarten von huH-4/3 und huH-4/9 sind in Abb. 7 zusammenfassend dargestellt.

3.1.1 Kartierung von huH-4/3

Die Restriktionskartierung erfolgte nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Southern Analysen mit ^{32}P -HBV DNA bzw. ^{32}P -pHC79 DNA (Abb. 8). Folgende Enzyme hatten im Klon huH-4/3 zu häufig geschnitten, um die Reihenfolge und die gegenseitige Orientierung der



Abb. 7: Restriktionskarten zweier überlappender Cosmidklone aus der huH-4 Genbank in linearer Darstellung

Die humanen DNA Sequenzen der Cosmidklone huH-4/3 und huH-4/9 sind als dünne Striche, die virale DNA als schwarzer Balken und der Vektoranteil schraffiert gezeichnet. huH-4/3 besitzt eine Größe von 42 kb, huH-4/9 ist 45 kb lang.

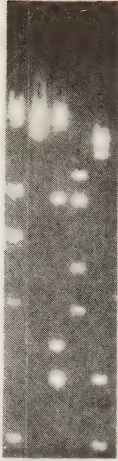
Fragmente festzulegen (vgl. dazu Abb. 12): HindIII (11,5 kb), PstI (7 kb), PvuII (8,8 kb), NcoI (13 kb/ 4,5 kb) und BglII (8,8 kb/ 3,9 kb/ 3,0 kb/ 0,47 kb). Die Größen (kb) der mit ^{32}P -HBV DNA hybridisierenden Banden sind in Klammern angegeben. Die Restriktionskarte ist in Abb. 9 wiedergegeben.

Der Klon huH-4/3 ist 42 kb groß, d.h. er enthält, ab-

zöglich des Vektoranteils von 6,4 kb, ein Insert von ca. 36 kb. Dies steht im Einklang mit der durchgeführten Größenselektion des Partialverdaus (s. 2.2) der genomischen DNA. Die integrierte HBV DNA Sequenz ist auf beiden Seiten von humaner DNA flankiert. Das somit vollständig klonierte HBV DNA Integrat der huH-4 Zelllinie besitzt eine Länge von mindestens 5 kb. Anscheinend liegt ein vollständiges HBV Genom von 3,2 kb vor. Der Übergang zwischen viraler und humaner DNA ist in, mit HBV DNA hybridisierenden, 2,3 kb großen EcoRI/XhoI-Subfragment (Abb. 8f) lokalisiert, da die DNA Sequenzen jenseits dieser EcoPI Schnittstelle nicht mehr mit HBV DNA hybridisieren. Der virale/humane Übergang auf der anderen Seite des HBV DNA-Integrates muß sich in 3,0 kb BamHI/XhoI-Fragment (Abb. 8d) befinden. Diese Bande zeigt nach längerer Exposition des Autoradiogramms ein schwaches Hybridisierungssignal mit ^{32}P -markierter HBV DNA. Die genaue Lage der viralen/humanen DNA-Übergänge, und damit auch die exakte Länge der integrierten HBV Sequenz, werden später erläutert (s. 3.2.3).

Die Echtheit des huH-4/3 Klones wird durch Tab. 3 belegt. Da die mit HBV hybridisierende 9,8 kb EcoRI-, 11,5 kb HindIII- und 7 kb PstI-Bande auch in der Southern Analyse der huH-4 Zelllinie mit ^{32}P -HBV DNA (vgl. Abb. 4) detektiert wurde, kann er sich bei huH-4/3 um kein Klonierungsartefakt handeln.

M1 a b c d



M1 a b c d



M1 a b c d



HBV

pHC79

M1 e f



M1 e f



M1 e f



HBV

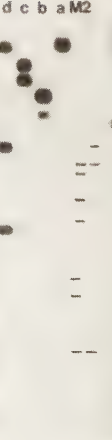
pHC79

0,6% Agarosegel

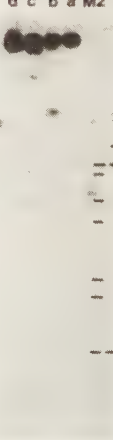
d c b a M2 M1



d c b a M2 M1



d c b a M2 M1



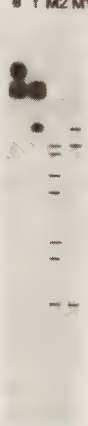
HBV

pHC79

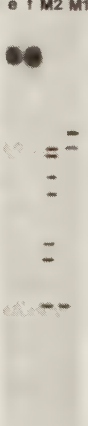
e f M2 M1



e f M2 M1



e f M2 M1

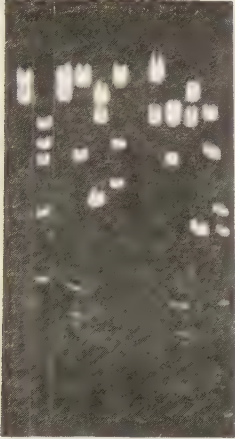


HBV

pHC79

1,5% Agarosegel

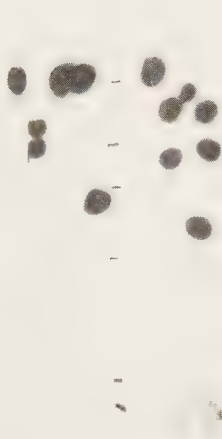
g h i j k M1 l m n o



g h i j k M1 l m n o



g h i j k M1 l m n o

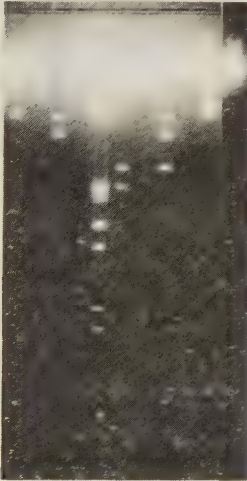


HBV

pHC 79

0,6% Agarosegel

o n m l M2 M1 k j i h g



o n m l M2 M1 k j i h g



o n m l M2 M1 k j i h g



HBV

pHC 79

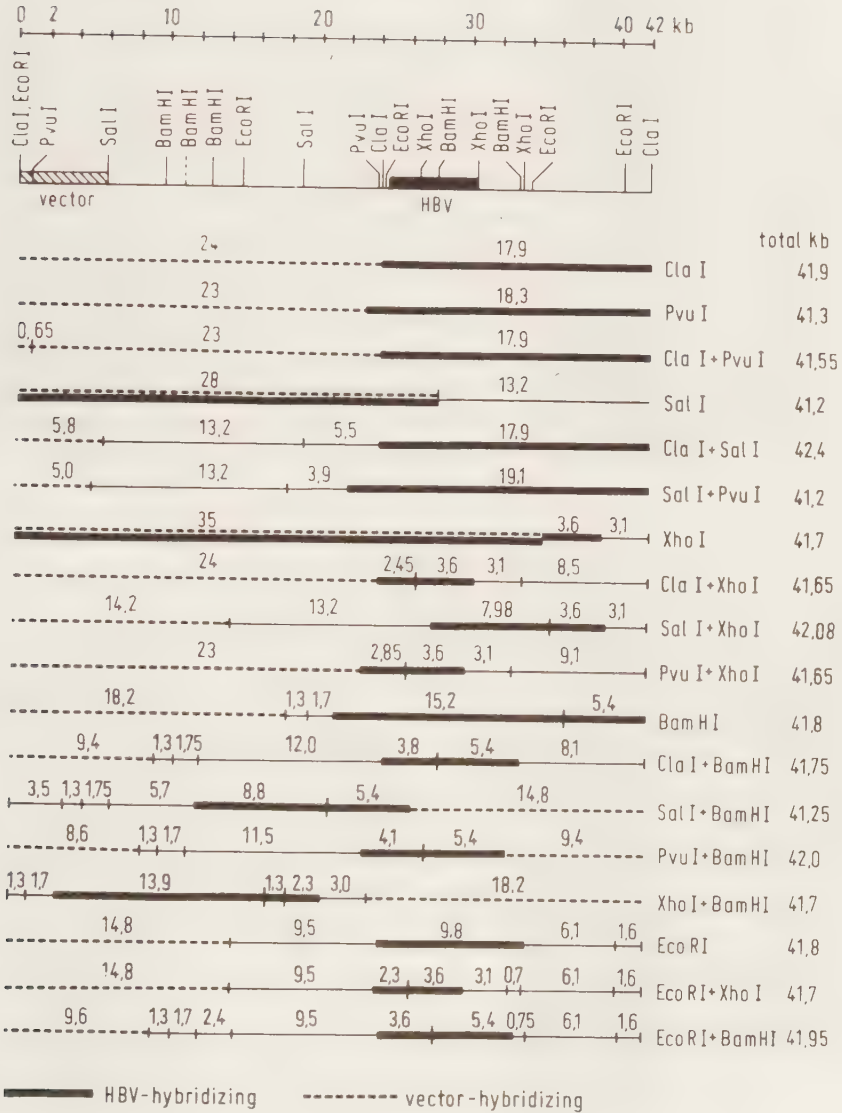
1,5% Agarosegel

Abb. 8: Restriktionskartierung von huH-4/3

Der Cosmidklon huH-4/3 wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen gespalten und die entstandenen Fragmente auf einem 0,6%igem und 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Neben den Gelbildern sind die Autoradiographien der Southern Analyse (s. D 2.8.3), bei der ^{32}P -markierte HBV DNA (s. D 2.9) bzw. ^{32}P -markierte pHC 79 DNA (s. D 2.9) verwendet wurde, abgebildet. huH-4/3 DNA ist geschnitten mit PvuI (a), PvuI und XhoI (b), PvuI und BamHI (c), XhoI und BamHI (d), EcoRI und BamHI (e), EcoRI und XhoI (f), ClaI (g), ClaI und BamHI (h), ClaI und PvuI (i), ClaI und XhoI (j), ClaI und SalI (k), SalI (l), SalI und XhoI (m), SalI und PvuI (n), SalI und BamHI (o). Als Größenmarker wurden HindIII verdauete Lambda DNA (M1) und HindIII/EcoRI doppelverdauete Lambda DNA (M2) eingesetzt.

Abb. 9: Restriktionskarte von huH-4/3 in linearer Darstellung

Die Größen der nach Restriktionsverdau entstandenen Subfragmente von huH-4/3 sind in kb angegeben. Subfragmente die mit HBV DNA hybridisieren sind fett, Fragmente die mit pHC 79 Vektor-DNA hybridisieren sind gestrichelt gezeichnet. Aus diesen Daten ergibt sich die oben dargestellte Restriktionskarte.



Restriktionskarte von huH-4/3 in linearer Darstellung

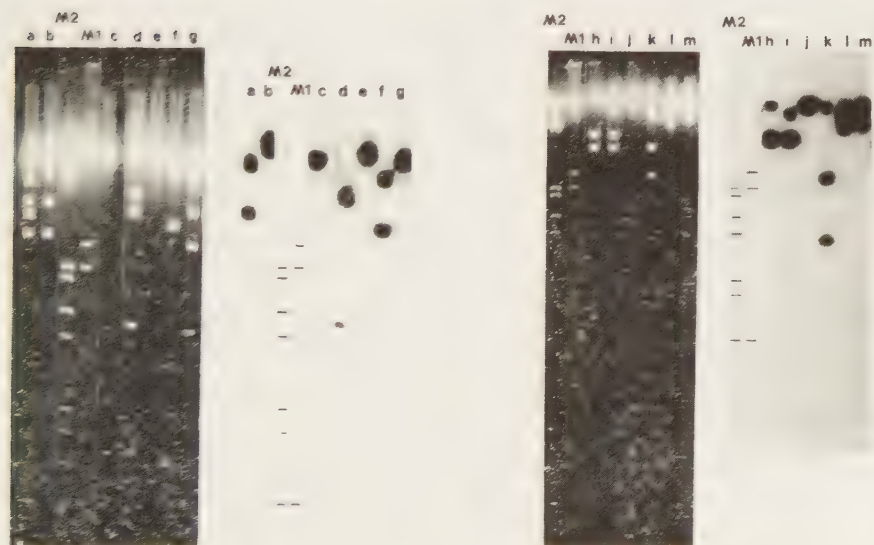
3.1.2 Kartierung von huH-4/9

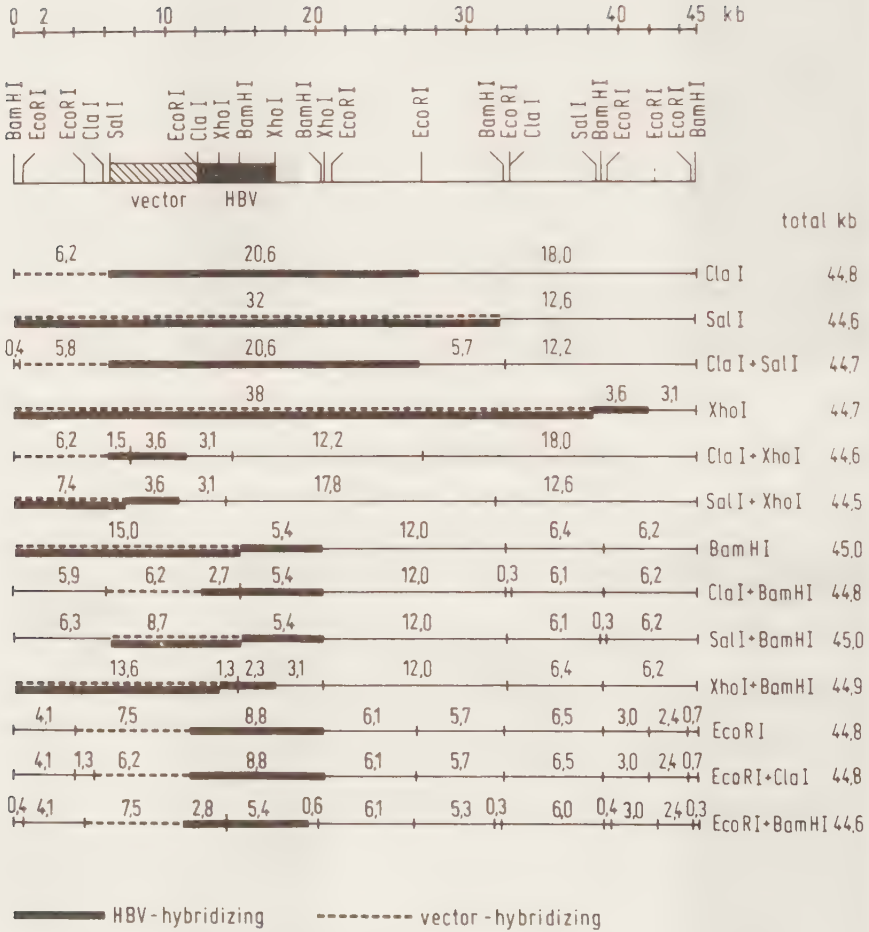
Die Restriktionskartierung (Abb.10) erfolgte analog der Kartierung von huH-4/3. Das Ergebnis, die Restriktionskarte, ist in Abb. 11 dargestellt.

huH-4/9 ist 45 kb groß, enthält also ein ca. 39 kb Insert. Die, nur einseitig von humaner DNA flankierte, integrierte HBV DNA Sequenz ist um ca. 850 bp verkürzt. Wie ein Vergleich der Restriktionskarten von huH-4/3 (Abb. 9) und huH-4/9 (Abb. 11) zeigt, reicht die Überlappung in der humanen DNA zumindest bis zur, 10 kb von der rechten viralen/humanen Übergangsstelle entfernten, EcoRI Schnittstelle. Den Klonen ist die Reihenfolge und die Distanz der Schnittstellen für EcoRI, BamHI und XhoI im Bereich der Überlappung gemeinsam.

Abb. 10: Restriktionskartierung von huH-4/9

Der Cosmidklon huH-4/9 wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen gespalten und die entstandenen Fragmente auf einem 0,6%igem und 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Neben den Gelbildern sind die Autoradiographien ³²P- markierte HBV DNA (s. D 2.9) verwendet wurde, abgebildet. huH-4/9 DNA ist geschnitten mit EcoRI und BamHI (a), EcoRI (b), ClaI (c), ClaI und XhoI (d), ClaI und SalI (e), ClaI und BamHI (f), ClaI und EcoRI (g), XhoI (h), XhoI und SalI (i), SalI (j), BamHI und XhoI (k), BamHI und SalI (l), BamHI (m). Als Größenmarker wurden HindIII verdaute Lambda DNA (M1) und HindIII/EcoRI doppelverdaute Lambda DNA (M2) eingesetzt.





Restriktionskarte von huH-4/9 in linearer Darstellung

Abb. 11: Restriktionskarte von huH-4/9 in linearer Darstellung

Die Größen der nach Restriktionsverdau entstandenen Subfragmente von huH-4/9 sind in kb angegeben. Subfragmente die mit HBV DNA hybridisieren sind fett, Fragmente die mit pHC79 Vektor-DNA hybridisieren sind gestrichelt gezeichnet. Aus diesen Daten ergibt sich die oben dargestellte Restriktionskarte.

3.2 Struktur und genetische Organisation der integrierten viralen DNA

In Kapitel 3.1 wurde die Grobkartierung der Cosmidklone huH-4/3 und huH-4/9 sowie die Lage der integrierten HBV DNA Sequenz erläutert (Abb. 7).

Da es sich bei huH-4/3 und huH-4/9 um das gleiche, singuläre HBV DNA Integrat aus der huH-4 Zelllinie handelt, das jedoch in huH-4/9 einseitig trunkiert ist, wird zur Aufklärung der Struktur und genetischen Organisation der viralen DNA durch Feinkartierung und teilweise DNA Sequenzierung (Sanger, 1977) der Cosmidklon huH-4/3 herangezogen. Die exakte Länge der integrierten HBV DNA Sequenz läßt sich ohnehin nur aus huH-4/3 ermitteln, und zwar durch Bestimmung der Integrationsstellen mit Hilfe der DNA Sequenzierung.

3.2.1 Bestimmung des HBV Subtyps

Um eine geeignete Auswahl an Restriktionsenzymen zur Feinkartierung der viralen DNA treffen zu können, soll zunächst der HBV Subtyp bestimmt werden. Es wird von der Annahme ausgegangen, daß im HBV Integrat zumindest ein komplettes HBV Genom vorliegt. Zur Unterscheidung der HBV Genome vom Subtyp adr (Ono, 1983), adr4 (Fuji-

yama, 1983), adw (Ono, 1983), adw2 (Valenzuela, 1980), adyw (Pasek, 1979) und ayw (Galibert, 1979) sind verschiedene Restriktionsenzyme bekannt. Es wurde folglich huH-4/3 DNA mit solchen Enzymen gespalten und eine Southern Analyse mit ^{32}P -markierter HBV DNA durchgeführt (Abb. 12). Die integrierte HBV DNA wurde von PstI und EcoRI nicht verdaut, von BamHI, NcoI und XhoI einmal gespalten, und von AccI, BglII und TaqI öfters geschnitten. Damit kommen nur die HBV Subtypen adr oder adr4 in Betracht, denn der Subtyp adw und adw2 (keine XhoI-; eine EcoRI-, PstI-, NcoI-, TaqI-; zwei BamHI-Schnittstellen), adyw (keine BglII-, NcoI-, AccI-, EcoRI-; eine PstI-; zwei XhoI-; drei BamHI-Stellen), ayw (eine EcoRI-, NcoI-, XhoI-, AccI-; drei BamHI-Spaltstellen) haben ein anderes Spaltungsmuster.

Ein Unterscheidungskriterium zwischen dem Subtyp adr und adr4 stellt die unterschiedliche Lage des 33 bp-Inserts dar, das im Subtyp adr4 in der Position von 2722-2754, im Subtyp adr dagegen in der Position von 2823-2855 (vgl. Abb. 2) anzutreffen ist. Diese zusätzlichen 33 bp konnten im HBV DNA Integrat durch die DNA-Sequenzierung, ausgehend von der TaqI-Stelle (Position 2844) in Richtung der linken humanen/viralen Übergangsstelle einerseits und in Richtung der HincII-Stelle (Position 2556) andererseits (vgl. Abb. 17), zwischen Position 2823 und 2855 lokalisiert werden. Die Subtypen ayw und adyw besitzen die 33 bp-Insertion nicht.

Alle Daten zusammengefaßt, handelt es sich bei der integrierten HBV DNA Sequenz um den Subtyp adr. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, daß in Japan, wo die huH-4 Zelllinie etabliert wurde, in ca. 95% der HBsAg-positiven Patienten der HBV Subtyp adr vorkommt (Nishioka, 1982). Alle, in den folgenden Kapiteln, angegebenen Sequenz-Positionen beziehen sich folglich auf die HBV Sequenz des Subtyps adr.

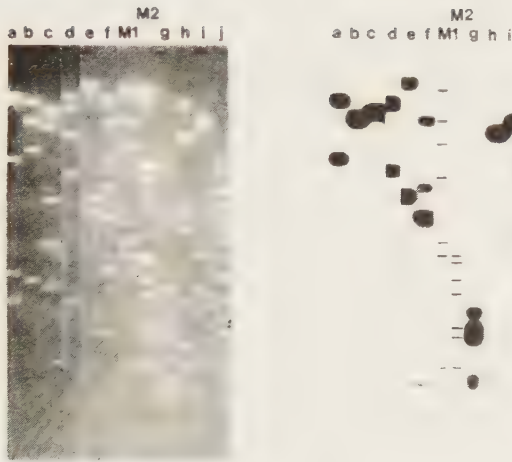


Abb. 12: Southern Blothybridisierung von huH-4/3 mit ^{32}P -markierter HBV DNA zur Bestimmung des HBV Subtyps

huH-4/3 DNA wurde mit BamHI (a), EcoRI (b), HindIII (c), NcoI (d), XhoI (e), BglII (f), TaqI (g), PstI (h), PvuII (i) und AccI (j) geschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt, auf NC Filter transferiert und mit ^{32}P -HBV DNA hybridisiert. Als Größenmarker wurden HindIII/restringierte Lambda DNA (M1) und HindIII/EcoRI doppelverdaute Lambda DNA (M2) eingesetzt.

3.2.2 Kartierung der viralen DNA

Die Durchführung der Restriktionskartierung wurde im Prinzip bereits in Kapitel 3.1 beschrieben. Zur Feinkartierung werden jedoch auch Restriktionsenzyme wie *TaqI* und *AccI* mit einer 4 bp Erkennungsstelle verwendet. Diese Enzyme schneiden öfters in der humanen und viralen DNA. Je geringer die Abstände zwischen den einzelnen Restriktionsstellen sind, desto genauer wird die Restriktionskarte. Durch Vergleich dieser Restriktionskarte mit der Genomkarte des HBV Subtyps adr kann geklärt werden, ob die viralen Gene strukturell intakt sind oder, ob z.B. in der viralen DNA kleine Deletionen oder Rearrangements vorliegen. Die strukturelle Intaktheit von Genen kann letztlich jedoch nur durch die DNA-Sequenzierung bewiesen werden.

Von allen getesteten Enzymen, die nicht im HBV DNA Integrat schneiden, erzeugte *PstI* das kleinste, die virale DNA enthaltende Fragment. Dieses Fragment ist mit 7 kb aber zu groß, um a) die Längenbestimmung der DNA Fragmente eines Verdau exakt zu gestalten und, b) um die Reihenfolge und Orientierung der vielen Subfragmente eines Restriktionsverdau mit einem 4 bp erkennenden Enzym bestimmen zu können. Daher wurden zwei, HBV DNA enthaltende Subklone geringerer Größe konstruiert. Da die Integrationsstellen der viralen DNA innerhalb des 2,3 kb *EcoRI/XhoI*-Fragments auf der einen Seite bzw. innerhalb der 3,0 kb *BamHI/XhoI*-Fragments auf der anderen Seite der integrierten HBV Sequenz lokalisiert sind, wurde zur Feinkartierung des HBV DNA Integrates das 3,55 kb *BamHI/EcoRI*-Fragment, im folgenden als Subfragment a bezeichnet, und das 5,4 kb *BamHI* DNA Insert, als Subfragment b abgekürzt, im Vektor pUC 19 subkloniert (Abb. 9).

Dazu mußten, nach Doppelverdau von huH-4/3 DNA mit *BamHI/EcoRI*, Subfragment a und b aus dem Gel elektro-

eluiert werden. Subfragment a DNA wurde mit BamHI/EcoRI doppelrestringierter pUC 19 DNA, und Subfragment b DNA mit CIP-behandelter, BamHI geschnittener pUC 19 DNA ligiert. Die Ligationsansätze wurden in kompetenten E.coli JM 109 Zellen transformiert und die Klone psub a (enthält Subfragment a) und psub b (enthält Subfragment b) isoliert. Die Inserts von psub a und psub b wurden, nach Abtrennung des Vektors, durch präparative Agarosegel-Elektrophorese gewonnen. Subfragment a und b werden getrennt kartiert und danach, über die gemeinsame BamHI Schnittstelle, zum vollständigen HBV DNA Integrat kombiniert.

Die Restriktionskartierung von Subfragment a und Subfragment b erfolgte nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Southern Analysen mit ^{32}P -markierter HBV DNA (Abb. 13, 14) bzw. mit ^{32}P -markierter, repetitiver Alu DNA (Autoradiographien nicht gezeigt). Die Alu DNA-Sequenz ist eine hochrepetitive humane Gensequenz, welche die Erkennungssequenz für das Enzym AluI enthält (Schmid, 1982; Übersichtsartikel). Die Restriktionskarte von Subfragment a ist in Abb. 15, die Karte von Subfragment b in Abb. 16 gezeigt.

Die Hybridisierung mit ^{32}P -Alu DNA wurde durchgeführt um sicherzustellen, daß auf den für die chromosomale Lokalisation der integrierten HBV DNA Sequenz herzustellenden Hybridisierungsproben (Probe a und b, siehe 3.2.4) keine repetitiven Sequenzen vorhanden sind. Subfragment a enthält keine repetitiven Alu Sequenzen, während hingegen im Subfragment b die repetitive DNA jenseits der TaqI Schnittstelle, im 1,31 kb TaqI/BamHI-Fragment lokalisiert werden konnte. Diese TaqI-Stelle ist ca. 2,7 kb von der viralen/humanen Übergangsstelle entfernt (Abb. 16).

Der virale/humane Übergang in Subfragment a muß in dem, mit ^{32}P -HBV DNA hybridisierenden, 0,4 kb TaqI-Fragment

liegen, da das 0,34 kb große TaqI/EcoRI-Fragment auch nach längerer Exponierung kein Hybridisierungssignal mit der HBV-Probe zeigt (Abb. 15). Analog wurde das rechte Ende der viralen DNA kurz nach der HincII Schnittstelle lokalisiert (Abb. 16), denn das 1,2 kb XhoI/XbaI-Fragment zeigt nach längerer Exponierung nur ein schwaches HBV-Hybridisierungssignal. Die exakten Integrationsstellen der viralen DNA werden in Kap. 3.2.4 bestimmt.

In Abb. 17 ist das Ergebnis der Kartierung von Subfragment a und b zusammengefaßt. Die exakte Länge des HBV DNA Integrates konnte, nach Sequenzierung der Integrationsstellen der viralen DNA, auf 5,4 kb festgelegt werden. Die genetische Organisation der integrierten HBV DNA Sequenz wurde durch Vergleich der Abfolge der Restriktionsschnittstellen und der dazwischen befindlichen Abstände im HBV DNA Integrat mit dem HBV Genom vom Subtyp adr (vgl. Abb. 2) aufgedeckt. Die integrierte HBV Sequenz ist bis auf eine Inversion am linken Ende (schematisch dargestellt durch die entgegengesetzte Pfeilrichtung der viralen Gene) kolinear mit der Sequenz vom Subtyp adr (vgl. auch Abb. 20). Diese Inversion wird in Kapitel 3.2.3 diskutiert. Die viralen Gene preS/S, X und C sind offensichtlich strukturell intakt. Die biologischen Funktionen dieser Gene werden später erörtert. Das P-Gen ist nicht vollständig vorhanden. Somit liegt kein vollständiges HBV Genom vor, obwohl das HBV Integrat aus mehr als einer HBV Genomlänge besteht. Zusätzlich zu den kompletten viralen Genen sind weitere Teile des preS/S-, C- und P-Gens vorhanden.

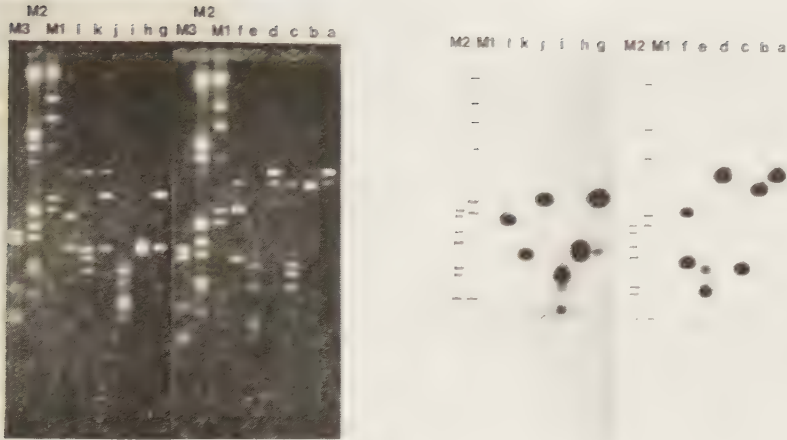


Abb. 13: Restriktionskartierung von Subfragment a

Das aus dem Plasmid psub a isolierte Subfragment a wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen gespalten und die entstandenen Fragmente auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Es sind jeweils die Gelbilder und die dazugehörigen Autoradiographien der Southern Analyse (s. D 2.8.3), bei der ^{32}P -markierte HBV DNA (s. D 2.9) verwendet wurde, gezeigt. Die DNA von Subfragment a ist geschnitten mit HindIII (a), AccI (b), HincII (c), NcoI (d), TaqI (e), XhoI (f), BglII (g), BglII und XhoI (h), BglII und TaqI (i), BglII und HincII (j), BglII und AccI (k). Als Größenmarker wurden HindIII verdauete Lambda DNA (M1), HindIII/EcoRI doppelverdauete Lambda DNA (M2) und TaqI geschnittene pBR322 DNA (M3) eingesetzt.

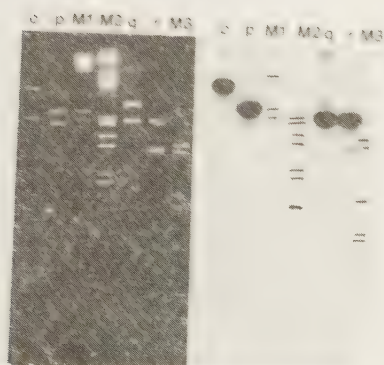
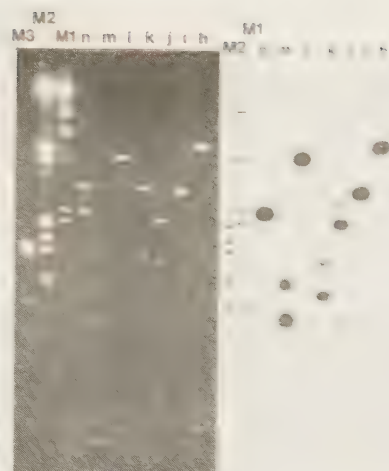
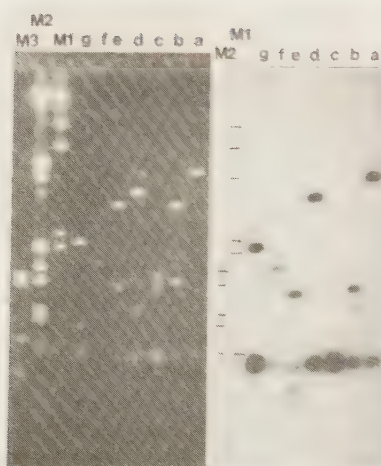


Abb. 14: Restriktionskartierung von Subfragment b

Das aus dem Plasmid psub b isolierte Subfragment b wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen gespalten und die entstandenen Fragmente auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Es sind jeweils die Gelbilder und die dazugehörigen Autoradiographien³² der Southern Analyse (s. D 2.8.3), bei der ³²P-markierte HBV DNA (s. D 2.9) verwendet wurde, gezeigt. Die DNA von Subfragment b ist geschnitten mit HindIII (a), PstI (b), AccI (c), HincII (d), NcoI (e), TaqI (f), XhoI (g), BglII (h), BglII und XhoI (i), BglII und TaqI (j), BglII und NcoI (k), BglII und HincII (l), BglII und AccI (m), BglII und PstI (n), XbaI (o), XbaI und XhoI (p), MstII (q), MstII und XbaI (r). Als Größenmarker wurden HindIII verdaute Lambda DNA (M1), HindIII/ EcoRI doppelverdaute Lambda DNA (M2) und TaqI geschnittene pBR322 DNA (M3) eingesetzt.

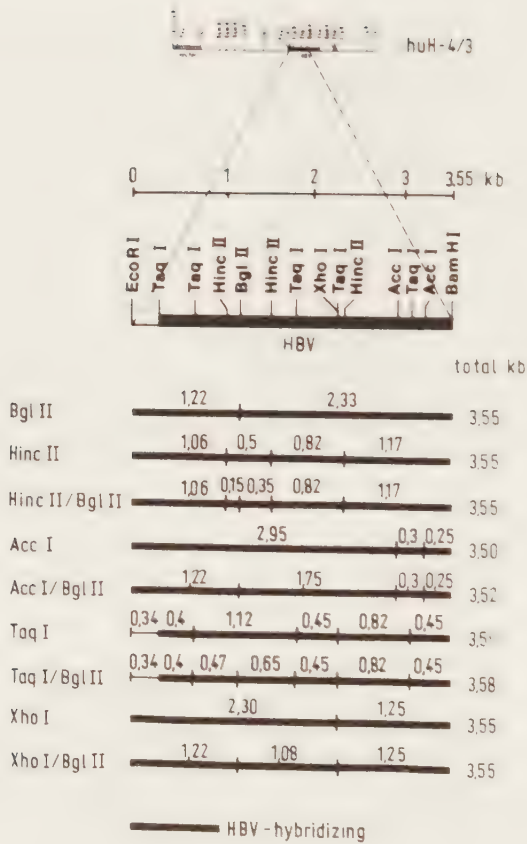


Abb. 15: Restriktionskarte von Subfragment a

Die Größen der nach Restriktionsverdau entstandenen Fragmente von Subfragment a sind in kb angegeben. Fragmente die mit HBV DNA hybridisierten sind fett gezeichnet. Aus diesen Daten ergibt sich die oben dargestellte Restriktionskarte.

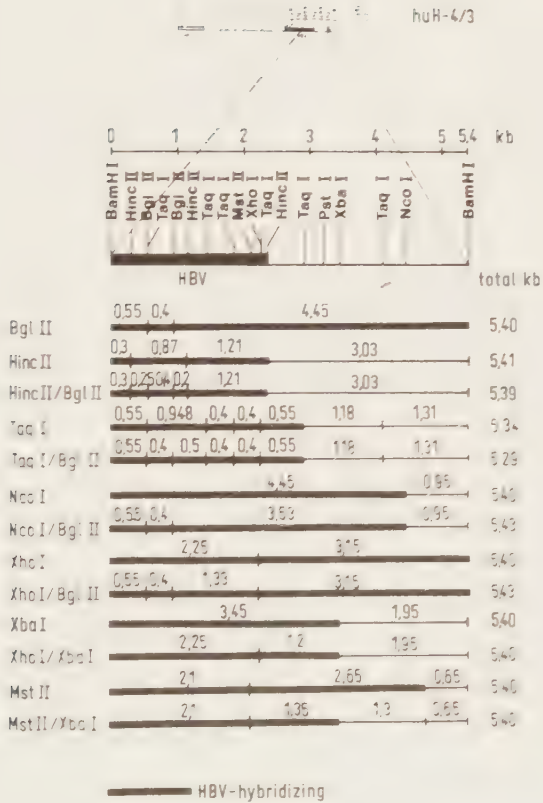
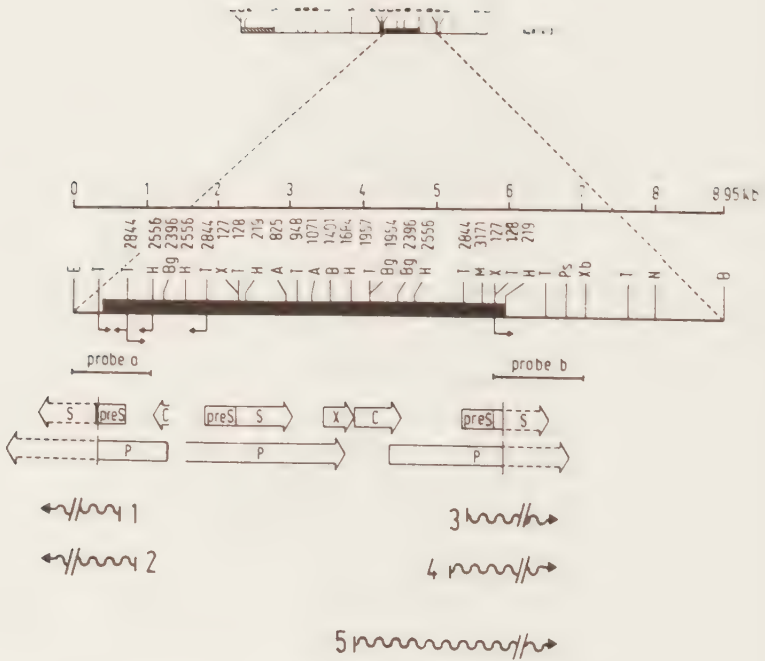


Abb. 16: Restriktionskarte von Subfragment b

Die Größen der nach Restriktionsverdau entstandenen Fragmente von Subfragment b sind in kb angegeben. Die mit HBV DNA hybridisierenden Fragmente sind fett gezeichnet. Aus diesen Daten ergibt sich die oben gezeigte Restriktionskarte.



Genetic organization of the integrated HBV DNA sequence in huH-4 hepatoma cells

A. Acc I,	C. Cla I,	M. Mst II,	P. Pvu I,	Xb Xba I,
B. Bam HI	E. Eco RI	N. Nco I	S. Sal I	X. Xho I
Bg. Bgl II	H. Hinc II	Ps. Pst I	T. Taq I	

Abb. 17: Genetische Organisation der integrierten HBV DNA Sequenz

Die oben dargestellte Restriktionskarte des HBV DNA Integrates ist aus den Karten von Subfragment a und Subfragment b zusammengesetzt, die über die BamHI-Schnittstelle bei Position 1401 kombiniert wurden. Die Sequenz-Positionen der Restriktionsschnittstellen über der Restriktionskarte entsprechen den Positionen der kolinearen Sequenz im HBV Subtyp adr. Die dünn gezeichneten Pfeile repräsentieren die sequenzierten DNA-Bereiche. Die Anordnung der viralen Gene (offene Pfeile) in der integrierten HBV Sequenz ist unterhalb der Restriktionskarte dargestellt, wobei gestrichelt gezeichnete, offene Pfeile am linken und rechten Ende des HBV DNA Integrates lediglich die Transkriptionsrichtung dieser Gene andeuten sollen. Unten in der Abbildung sind die durchnummerierten, hypothetischen viralen/zellulären Fusionstranskripte wiedergegeben.

3.2.3 Nachweis einer Inversion in huH-4/3

Wie ein Vergleich der Lage der Restriktionsenzym-Schnittstellen in der integrierten HBV Sequenz, und der Distanzen zwischen diesen Schnittstellen, mit dem HBV Genom vom Subtyp adr ergab, umfaßt die Inversion zumindest den Bereich von der BglIII-Schnittstelle (Position 2396; auf dem Maßstab in Abb. 17 bei ca.1,2 kb) bis zur linken viralen/humanen Übergangsstelle (Abb. 17). Es lag die Vermutung nahe, daß der Inversionspunkt zwischen der BglIII-Stelle bei Position 2396 und der HincII-Spaltstelle (Position 2556; auf dem Maßstab in Abb. 17 bei ca.1,6 kb), innerhalb des 1,12 kb großen TaqI-Fragmentes (Position 2844-2844) am linken Ende des HBV DNA Integrates (vgl. auch Abb. 15), liegt. Diese Annahme konnte durch die DNA-Sequenzierung des 1,12 kb TaqI-Fragmentes bestätigt werden.

Subfragment a wurde mit TaqI geschnitten, das 1,12 kb-Fragment geleluert und in einem Phosphatase-behandeltem, AccI restringiertem (kompatibel mit TaqI) pUC 19-Vektor subkloniert. Die Ansequenzierung von beiden Seiten, in Richtung der HincII-Stellen bei Position 2556, zeigte, daß die sequenzierten Bereiche spiegel-symmetrisch sind und auch eine 100%ige Homologie zur entsprechenden Sequenz des HBV Subtyps adr aufweisen. Die, zwischen diesen beiden HincII-Stellen (Position 2556-2556; auf dem Maßstab in Abb. 17 bei ca.1 bzw. 1,6 kb) zur BglIII-Stelle (Position 2396) spiegel-symmetrische, 160 bp von der rechten HincII-Schnittstelle entfernte BglIII-Schnittstelle bei Position 2396 (auf dem Maßstab in Abb. 17 bei ca.1,4 kb) fehlt (Abb. 17). Hier, im 3'-Ende des HBc Gens wird der Inversionspunkt vermutet.

Dementsprechend wären das 5'-Ende des P-Gens (Start bei Position 2280) sowie noch ca. 250 bp des 3'-Endes des C-Gens vorhanden.

3.2.4 Analyse der viralen/zellulären Übergänge

Im Vordergrund stand die Frage, ob die Integration der HBV DNA in eine spezifische Region eines humanen Gens (z.B. eines Onkogens) stattfand und, ob dies in einem Zusammenhang mit der malignen Transformation der Zelle stehen könnte. Durch Ansequenzieren der zum HBV Integrat flankierenden zellulären DNA Sequenzen kann auch überprüft werden, ob in Analogie zu den Retroviren, eine Verdoppelung flankierender humaner Sequenzen eingetreten ist (s. Einleitung).

Da in den meisten bisher untersuchten klonierten HBV spezifischen Integraten aus anderen Zelllinien und Tumoren die Integrationsstellen in der viralen "gap"-Region oder im Bereich der "inverted repeats" (DR1 und DR2) (Einleitung) liegen, sollte dieser Sachverhalt auch in der integrierten HBV DNA Sequenz aus der huH-4 Zelllinie untersucht werden. Sowohl für die "gap"-Region als auch für die terminalen Duplikationen wird eine mögliche funktionelle Rolle bei der Integration diskutiert.

Die Integrationsstellen der viralen DNA im humanen Genom wurden schon in Kap. 3.2.2 grob lokalisiert und sollen nun durch die DNA-Sequenzierung des 0,4 kb TaqI-Fragmentes am linken Ende und des 1,2 kb XhoI/XbaI-Fragmentes am entgegengesetzten Ende der integrierten HBV Sequenz genau bestimmt werden (Abb. 17). Nach Restriktionsverdau von Subfragment a DNA mit TaqI wird das 0,4 kb große TaqI-Fragment (Abb. 15) geleluert und in einem dephosphoryliertem, AccI geschnittenem (kompatibel mit TaqI) pUC 19-Vektor subkloniert. Das 1,2 kb XhoI/XbaI-Fragment (Abb. 16) wird nach entsprechendem Doppelverdau der DNA von Subfragment b, und nachfolgender Elektroelution aus dem Gel, in einem CIP-behandeltem, SalI/XbaI gespaltenem (SalI ist kompatibel mit XhoI) pUC 19-Vektor subkloniert.

Durch die DNA-Sequenzierung dieser Plasmide nach der Methode von Sanger (1977) konnten die Integrationsstellen der integrierten HBV DNA Sequenz der Position 33 im preS-Bereich einerseits (Abb. 18) und der Position 233 im HBs Gen andererseits (Abb. 19) zugeordnet werden. Beide Integrationsstellen liegen somit offensichtlich im "gap"-Bereich (Abb. 20).

Ein Vergleich der sequenzierten humanen DNA-Regionen die das HBV DNA Integrat flankieren zeigte, daß diese unterschiedlich sind.

Da ein Sequenz-Vergleich der viralen/humanen Übergangsstellen untereinander keine Homologien aufzeigte, kann also von einer unspezifischen Integration des HBV sowohl auf viraler als auch auf zellulärer Ebene ausgegangen werden.

Abb. 18: Bereich des viralen/humanen Übergangs am linken Ende der integrierten HBV DNA Sequenz

Die Nukleotidsequenz des 0,4 kb TaqI-Fragmentes (obere Sequenzzeile, kleine Buchstaben) wird, ausgehend von der zellulären TaqI- und viralen TaqI-Stelle, mit der DNA-Sequenz des HBV Subtyps adr (untere Sequenzzeile, große Buchstaben) verglichen. Der virale/humane Übergang liegt bei Position 33. Das zweite ATG-Startkodon des preS-Leserahmens sowie der SV40 ähnliche HBs Promoter sind gekennzeichnet. Der virale Leserahmen preS/S reicht bis in die humanen Sequenzen und könnte zu einem Fusionsprotein führen.

SV40 ähnlicher Promoter HBs

```

119      ttgggggtgtgttccctagttacccggtctccggttagtccatcctcgccctcgtaagcc
      IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
2962    AACCCCAACAAGGATCAATGGCCAGAGGCAAATCAGGTAGGAGCGGGAGCATTCCG

60      tagtggtcaacctgggacgcaagcctcggttgagtttggttaggtctaacctgaag
      IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
2903    ATCACCAGTTGGACCTGCGTTCGGAGCCAACTCAAACAATCCAGATTGGGACTTC

1      agctattccgtaccacctgcttagaaaagacaagggttaggagaccctaagaaagggc
      IIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
2844    TCGACAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCC

```

```

1      tcttgacccctgggacgtggcttgtacctcttgtgtttagtctcaaggatcctgggga
      IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
131    AGGACTGGGGACCCTGCACCGAACATGGAGAACACAACATCAGGATTCCTAGGACCCCT
      
      viral      human
60     cgagcacaatgtccgccccaaaaagaacaactgttcttttgtcgagcgcgaggtccca
      IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
190    GCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTTGACAAGAA      233
119    cgccctgcggtcgctcccggtcgccctctctccagcttagccgqatcc

```

Abb. 19: Bereich des viralen/humanen Übergangs am rechten Ende der viralen DNA

Die Nukleotidsequenz des 1,2 kb XhoI/XbaI-Fragmentes (obere Sequenzzeile, kleine Buchstaben) wird, ausgehend von der viralen XhoI-Stelle, mit der DNA-Sequenz des HBV Subtyps adr (untere Sequenzzeile, große Buchstaben) verglichen. Der virale/humane Übergang liegt bei Position 233, in der viralen "gap"-Region. Das ATG-Startkodon des HBs-Leserahmens ist eingezeichnet.

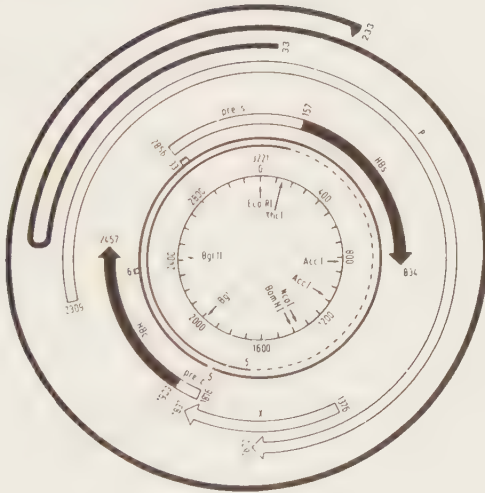


Abb. 20: Genetische Organisation und Integrationsstellen des HBV DNA Integrates

Die genetische Organisation der viralen DNA wurde bereits detailliert in Abbildung 17 dargestellt und ist hier nur schematisch wiedergegeben. Die integrierte HBV DNA Sequenz ist als fette, das HBV Genom vom Subtyp adr umgebende, schwarze Linie gezeichnet. Die Lage der Integrationsstellen ist indiziert (Position 33 und 233).

3.2.4.1 Das IgG Gen als Integrationslocus der viralen DNA?

Um zu überprüfen, ob die Integration des HBV in eine bekannte zelluläre Region stattfand, wurden die sequenzierten, zum HBV Integrat flankierenden, humanen Sequenzen mit der Nukleinsäure-Datenbank der National Biomedical Research Foundation (Georgetown University, Washington, D.C.) verglichen. Diese Datenbank enthält 1,3 Millionen Basen.

Die sequenzierte, humane Sequenz am linken Ende des HBV Integrates ist mit 32 bp zu kurz (Abb. 18), um aussagekräftige Schlüsse aus einer Homologiestudie mit dieser Datenbank ziehen zu können. Ein Vergleich der sequenzierten 72 Basen zellulären Ursprungs der rechten viralen/zellulären Übergangsstelle (Abb. 19) mit der Nukleinsäure Datenbank zeigte, daß die Integration des HBV in eine Region stattfand, die verwandt ist zur Intron 4-Sequenz der schweren Kette des IgG-Gens (Ellison, 1981) (Abb. 21). Die bp-Homologie von "nur" ca. 60% kann durch die bekannte Variabilität einer solchen Intron-Region erklärt werden (Takahashi, 1982).

Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wird zur Zeit die chromosomale Lokalisation des HBV Integrats bestimmt, und zwar:

- a) mittels in situ-Hybridisierung der huH-4 Zelllinie (in Zusammenarbeit mit N. Arnold, Universität München) und
- b) mit Hilfe einer Hybridisierung von Maus/Mensch-Zellhybriden (in Kollaboration mit K.H. Grschezik, Universität Münster).

Als Hybridisierungsproben wurden jeweils ein 1,06 kb großes EcoRI/HincII-Fragment (probe a) und das 1,2 kb XhoI/XbaI-Fragment (probe b) verwendet (Abb. 17). Beide Proben enthalten keine repetitive DNA, die mit humaner DNA kreuzhybridisieren und somit zu falsch-positiven

Hybridisierungssignalen führen würde. Die Herstellung von Probe b wurde bereits im letzten Kapitel beschrieben. Probe a wird durch Doppelverdau von Subfragment a DNA mit EcoRI und HincII (Abb. 15), nachfolgender Gel- elution und Subklonierung in einem CIP-behandeltem, EcoRI/HincII-doppelrestringiertem pUC 19-Vektor gewonnen.

Human Ig germline H-chain S-E-A region B; J
59.7% identity in 72 NT overlap

```

flank      1'                                     NAAACAGCTCGCGCTCC-
IgG 1321"  AGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCGCTCGCGCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
                                     .:: :: :: :: ::
flank      18' -AGGGTGCAGGGAC-GCCAGCGAGGGGCCAGCGACAGAGSTCGAATCGGCTAGG
                                     :: :: :: :: :: :: :: :: ::
IgG 1381"  AAGGTGGGACCCACGGGTGLGAGGGCCACACCGACAGAGGCCAGCTCGGCCACGCTCT
                                     :

```

Abb. 21: Vergleich von zellulären, zum HBV Integrat flankierenden, DNA-Sequenzen mit dem IgG Gen

Es besteht eine 60%ige Sequenzhomologie zwischen den sequenzierten 72 humanen Nukleotiden des 1,2 kb XhoI/XbaI-Fragments (obere Sequenzzeile) und dem Intron 4 der schweren Kette des IgG Gens (untere Sequenzzeile).

3.3 Transkription und Translation von huH-4/3

Aufgrund der Struktur der integrierten HBV DNA Sequenz (Abb. 17) sollte das HBs-, HBc- und HBx-Gen funktionsfähig sein (siehe 3.2.2). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Expression der Antigene des HBs- und HBc-Gens mit Hilfe eines Radioimmuntests (RIA) bestimmt. Ein Meßsystem für die biologische Aktivität des HBx Gens, der CAT Aktivitätstest, wird später vorgestellt (siehe 3.6).

Ferner sollen die sequenzierten, humanen DNA-Bereiche auf die Anwesenheit von Expressionssignalen hin untersucht werden. Damit könnten mögliche virale/humane Fusionsproteine oder die Stimulierung der Expression humaner Gene durch einen viralen Promoter erklärt werden.

3.3.1 Test auf Expression von HBsAg und HBc/eAg

Die genaue Lage und Funktion der Expressionssignale für das HBs- und HBc-Gen ist in Kapitel B 2.1 bereits beschrieben worden. Wie aus den Daten der Restriktionskartierung folgt (Abb. 17), sollten neben der kompletten preS/S-Region auch die beiden dazugehörigen HBs Promotoren, die TATA-Box und der SV40 ähnliche Promoter, im HBV Integrat vorhanden sein. Die TATA-Box konnte durch Sequenzierung des entsprechenden DNA-Bereichs nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Das im HBc Gen liegende virale Polyadenylierungssignal (TATAAA), das für die Prozessierung der mRNA notwendig ist, sollte ebenfalls vorhanden sein. Die Anwesenheit von preS-Sequenzen am linken und rechten Ende des HBV DNA Integrats wird später diskutiert (siehe 3.3.2).

Außerdem besitzt die integrierte HBV DNA Sequenz, der Restriktionskarte entsprechend, ein komplettes C-Gen und den HBc Promoter. Obwohl die virale 3,5 kb mRNA,

von welcher normalerweise das HBcAg translatiert wird, aufgrund des 5'-deletierten P-Gens nicht synthetisiert werden kann (s. 3.2.2), ist eine HBcAg Expression von dem viralen/humanen Fusionstranskript 5 (vgl. Abb. 17) anzunehmen, denn das HBcAg Stop-Kodon sollte der Restriktionskarte entsprechend vorhanden sein. Das Fusionstranskript 5 startet in Position 1874 in Richtung der rechten viralen/humanen Übergangsstelle und reicht bis an ein in der flankierenden, humanen DNA vorhandenes Poly(A) Signal. Die ca. 250 bp vom 3'-Ende des C-Gens, am Beginn der Inversion (siehe 3.2.3), besitzen für die Expression keine Relevanz. -

Um die Funktionsfähigkeit des HBsAg- und HBcAg-Gens zu überprüfen, wurden 10 µg huH-4/3 DNA mit 10 ng pAGO DNA (s. D 1.5), die das Thymidinkinase (tk)-Gen aus dem Herpes Simplex Virus enthält, mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode in Maus Ltk-Zellen kotransfiziert. Anschließend wurde auf tk-DNA enthaltende Zellen (Ltk⁺) in HAT-Medium selektioniert. Ltk⁻-Zellen dagegen sterben in Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthaltendem Medium. Alle Ltk⁺-Zellen sollten die, im 100-fachen Überschuß gegenüber der pAGO DNA eingesetzten, huH-4/3 DNA enthalten. Als Positivkontrolle für die HBsAg Expression wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen das HBV-Plasmid pkkHBs34 (Wang, 1982) transfiziert. 14 - 17 Tage nach der Transfektion wurden tk-positive Zellklone isoliert und mittels Radioimmuntest (RIA; AUSRIA, Firma Abbott) die HBsAg- bzw. HBc/eAg-Expression aus den Überständen konfluenter Zellrasen gemessen. Der verwendete RIA kann nicht zwischen HBcAg und HBsAg diskriminieren.

In Tabelle 4 ist eine RIA Analyse der HBsAg Expression der isolierten Zellklone wiedergegeben. Alle untersuchten, tk-positiven Kolonien waren wie erwartet HBsAg positiv. Die durchschnittliche HBsAg Expression pkkHBs

34-enhaltender Zellklone lag dabei in der gleichen Größenordnung wie die der Zellklone, die huH-4/3 DNA enthalten. Dies beweist die Intaktheit des HBs Gens in der infizierten HBV DNA Sequenz der huH-4 Zelllinie.

Tabelle 4: HBsAg-Expression von huH-4/3 DNA enthaltenen Maus Ltk-Zellen

Ltk ⁺ -Klon	P/N
1/3	3,6
1/19	7,6
1/15	24
2/15	36
1/1	50
1/5	54
1/4	74
1/18	88
2/1	120
2/5	150
2/14	174
Mittelwert:	71

Ein Zellklon ist HBsAg positiv, wenn sein P/N-Wert (gemessener Wert geteilt durch den Wert der Negativkontrolle) $\geq 2,1$ ist. Da der cpm Wert nur bis P/N = 30 linear mit der HBsAg Menge ansteigt, wurden Überstände mit einem P/N > 30 verdünnt gemessen und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Die HBsAg Expression war jedoch in verschiedenen Zellklonen unterschiedlich hoch. Wie eine slot blot Hybridisierung der DNA aus diesen Zellklonen mit einer ³²P-markierten HBV Probe zeigte, steht die Menge integrierter DNA in keinem direkten linearen Zusammenhang mit der Expression von HBsAg (nicht abgebildet). Zusätzlich müssen andere Parameter wie der Einfluß flankierender Ltk-Sequenzen (z.B. Ltk-Enhancer, -Promoter) zur Er-

klärung der unterschiedlichen HBsAg Expression hinzugezogen werden.

Unter den soeben beschriebenen Versuchsbedingungen ließ sich HBsAg auch in Maus NIH 3T3 Zellen und in HepG2 Zellen exprimieren.

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob die Glucocorticoid-Rezeptorsequenz (GRE, s. B 2.1) in der integrierten HBV DNA Sequenz funktionsfähig ist. Dazu wurde die Stimulierung der HBsAg Expression des Ltk⁺-Klones 2/14 durch Dexamethason (Dex) gemessen. Bei einer Konzentration von 1 μ M Dex im Medium stieg nach 48 h der P/N-Wert im HBsAg RIA um den Faktor 2 verglichen mit dem P/N-Wert von Ltk⁺-2/14 ohne Dex im Medium. Hingegen ließ sich die Expression von HBsAg bei einer Konzentration von 10 μ M Dex im Medium, vermutlich aufgrund eines Sättigungseffekts, kaum noch steigern. Die "GRE"-Region scheint damit offenbar intakt zu sein.

Von allen isolierten, HBsAg positiven Ltk⁺-, HepG2- und NIH 3T3-Zellklonen wurden die Überstände mittels des Abbott-HBe Radioimmuntests auf die Anwesenheit von HBcAg getestet. In keinem Fall konnte eine Expression von HBcAg detektiert werden. Als Erklärung dafür könnte:

- a) eine Mutation innerhalb des C-Gens oder
- b) die Unterdrückung der HBcAg Expression durch Methylierung des HBc Gens (Yoakum, 1983) in Frage kommen.

3.3.2 Expressionssignale in der humanen DNA

Der virale/humane Übergang auf der linken Seite des HBV DNA Integrats liegt in der viralen preS2-Region (bei Position 33), der rechte virale/humane Übergang in der viralen S-Region (bei Position 233) (Abb. 17 und 20).

Auf beiden Seiten sind die beiden HBs Promotoren vorhanden. Da das virale Poly(A)-Signal fehlt, müssen die HBs-Transkripte (Fusionstranskripte 1 - 4, Abb. 17) und das in Position 1874 in Richtung der rechten viralen/humanen Übergangsstelle startende "RNA Pregenom" (Fusionstranskript 5, Abb. 17) bis an ein in der flankierenden, humanen DNA vorhandenes Polyadenylierungssignal reichen. Die Computeranalyse ergab, daß das für die Prozessierung der Transkripte notwendige Poly(A)-Signal auf beiden Seiten, jenseits der sequenzierten humanen DNA Bereiche liegt.

Die von der linken Seite des HBV Integrats ausgehenden Fusionsproteine müßten, aufgrund eines fehlenden Stop-Kodons in der humanen DNA, aus 133 AS (bei Start in preS1; vgl. Abb. 17; Fusionstranskript 2) bzw. 13 AS (bei Start in preS2; vgl. Abb. 17; Fusionstranskript 1) viralen Ursprungs und mindestens 11 humankodierten AS bestehen (Abb. 18). Unter der Annahme, daß das Initiations-Kodon des P-Gens noch vorhanden ist (s. 3.2.3), sollte ein weiterer Fusions-Leserahmen, bestehend aus dem 5'-Teil des P-Gens und humanen Sequenzen, existieren. Dieser Leserahmen könnte jedoch, aufgrund des fehlenden viralen Promoters, nicht exprimiert werden.

Auf der rechten Seite der integrierten HBV DNA Sequenz existieren drei, humane und virale Information beinhaltende, Leserahmen. Da in der sequenzierten humanen DNA keine Stop-Kodons gefunden wurden, sollten die Fusionsproteine aus 209 "viralen" AS (bei Start in preS1; vgl. Abb. 17; Fusionstranskript 4), 154 "viralen" AS (bei Start in preS2; vgl. Abb. 17; Fusionstranskript 3) und/oder 26 "viralen" AS (bei Start im S-Gen; vgl. Abb. 17; Fusionstranskript 3) und mindestens 24 C-terminalen, human-kodierten AS bestehen. Ein weiteres mögliches Fusionsprotein besteht aus 380 viral-kodierten AS (bei

Start im P-Gen; vgl. Abb. 17; Fusionstranskript 5) und mindestens 24 AS humanen Ursprungs am C-terminalen Ende.

3.4 Zwischenzusammenfassung

Die bisherigen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die humane Hepatom-Zelllinie huH-4 enthält ein singuläres HBV DNA Integrat,
- 2) die Cosmidklonierung dieser integrierten HBV DNA Sequenz führte zu zwei überlappenden Klonen, huH-4/3 und huH-4/9 (Abb. 7). In huH-4/3 ist die virale DNA auf beiden Seiten von humaner DNA flankiert, wohingegen in huH-4/9 das um ca. 850 bp verkürzte HBV Integrat nur auf der rechten Seite von humanen DNA Sequenzen flankiert ist,
- 3) die virale DNA in huH-4/3 besteht aus mehr als einer Einheitslänge eines HBV Genoms (Abb. 20). Sie ist, bis auf eine Inversion am "linken" Ende, Kolinear mit dem HBV Subtyp adr. Die HBV-Integrationsstellen sind bezogen auf die virale DNA Sequenz, nämlich bei Position 33 bzw. 233, unterschiedlich. Alle viralen Gene, bis auf das P-Gen, sind unter Berücksichtigung der Restriktionskarte offensichtlich strukturell intakt,
- 4) die integrierte HBV DNA Sequenz enthält ein funktionsfähiges S-Gen. Das C-Gen ist biologisch inaktiv. Mehrere virale/humane Fusionsproteine können synthetisiert werden,
- 5) die Integration des HBV hat offensichtlich in eine, zum IgG-Genlocus homologe Sequenz stattgefunden.

3.5 Onkogenes Potential der Cosmidklone

Das eigentliche Ziel der Cosmidklonierung war, zu überprüfen, ob die zum HBV Integrat flankierenden, humanen DNA Abschnitte eine transformierende Sequenz enthalten, die im Zusammenwirken mit der integrierten HBV DNA Sequenz im Sinne eines cis-Effekts zur malignen Transformation von Hepatozyten beitragen könnte.

Das Insert des Cosmidklons huH-4/9 ist 39 kb groß. Abzüglich der integrierten HBV Sequenz von 5 kb verbleiben 34 kb humaner DNA Sequenzen, welche die rechte virale/humane Übergangsstelle flankieren (siehe 3.1.2). Die humane DNA des Cosmidklons huH-4/3 ist, die virale DNA subtrahiert, 31 kb lang. Davon flankieren 19,5 kb die linke virale/humane Übergangsstelle und 11,5 kb, die mit der humanen DNA aus huH-4/9 vollständig überlappen, die rechte Übergangsstelle bei Position 233 (s. 3.1.1). Es können folglich 19,5 kb humaner DNA links des HBV DNA Integrats und 34 kb zelluläre, humane Sequenzen rechts der viralen DNA auf die Anwesenheit eines Onkogens untersucht werden. Dazu wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

3.5.1 Suche nach bekannten Onkogenen

Es wurden folgende, zum Zeitpunkt der Untersuchung erhältliche, Onkogenplasmide (s. D 1.5), die verschiedene virale (src, sis, fes, myc, fms, abl, myb, yes, Ha-ras, mos, raf, fos, fps, ros) oder zelluläre (ki-ras, myc, pim1, int1, int2, erbB, erbA, Blym, N-ras, N-myc) Onkogene enthalten, untersucht.

Die Onkogen-Inserts aus diesen Plasmiden wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen vom Vektor getrennt, die restringierten Ansätze auf je einem 0,8%-Agarosegel separiert und in einer Southern Analyse mit ^{32}P -mar-

kierter huH-4/3 DNA bzw. ^{32}P -huH-4/9 DNA hybridisiert (nicht gezeigt). Als Positivkontrolle wurde huH-4/3 bzw. huH-4/9 DNA verwendet. Die verwendeten Onkogene dürfen keine repetitiven DNA Sequenzen enthalten, da diese Sequenzen mit der, in den Cosmidklonen vorhandenen, hochrepetitiven Alu DNA kreuzhybridisieren würden. Aus diesem Grunde wurde nicht das vollständige myc-Onkogen, das im Intron zwischen Exon 2 und 3 repetitive DNA (Battey, 1983) enthält, sondern nur das c-myc Exon 2 und 3 eingesetzt. Dazu wurde aus pCMYC das, Exon 2 enthaltende, 1,4 kb SacI-Fragment und ein, das Exon 3 enthaltende, 1,5 kb ClaI/EcoRI-Fragment isoliert. Auf der Autoradiographie der Southern Analyse konnten keine signifikanten Hybridisierungssignale entdeckt werden, außer bei der Positivkontrolle und für den Vektoranteil der geschnittenen Onkogenplasmide. Die Kreuzhybridisierung mit dem Vektor ist durch die Anwesenheit des Cosmidvektors pHC79, einen pBP322-Derivat, auf den Cosmidklonen zu begründen. Es sind folglich keine Sequenzen der 19 getesteten Onkogene in huH-4/3 und huH-4/9 enthalten. Um die Gegenwart anderer möglicher transformierender Sequenzen auf den Cosmidklonen zu überprüfen, wurde das im nächsten Kapitel beschriebene Experiment durchgeführt.

3.5.2 Transformation von NIH 3T3 und Fisher rat Zellen

Als Arbeitshypothese für die Onkogenese wird ein "Vielstufen-Mechanismus" angenommen, d.h. mehrere Schritte sind zur malignen Transformation einer Zelle nötig. Die Mäusefibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 hat bereits fast alle diese Schritte durchlaufen und kann durch die meisten bekannten Onkogene wie z.B. ras transformiert werden. Morphologische Kriterien für den transformierten Status sind dreidimensionales Zellwachstum ("Focus")

durch Verlust der Kontaktinhibition sowie ein verändertes Aussehen. Im Lichtmikroskop erscheinen transformierte 3T3 Zellen spindelförmig und mit hell-leuchtenden Zellrändern, wohingegen bei untransformierten, flach ausgebreiteten 3T3 Zellen die Zellränder kaum erkennbar sind.

Um zu überprüfen, ob die huH-4 Zelllinie und die aus dieser Zelllinie klonierten DNA Abschnitte onkogene Eigenschaften besitzen, wurden je 10 µg huH-4, huH-4/3 und huH-4/9 DNA mittels der Calciumphosphat-Methode in NIH 3T3 Zellen transfiziert. Als Positivkontrolle wurden 0,5 µg DNA des viralen Ha-ras (H-1) Onkogens eingesetzt. Als eine Negativkontrolle wurden 10 µg pHC79 DNA verwendet. Alle Transfektionsansätze wurden mit Kalbs-thymus (kT)-DNA auf 20 µg Gesamt-DNA eingestellt. Um die Rate der spontan transformierten Zellen bestimmen zu können, wurden zwei weitere Negativkontrollen, Transfektion von kT-DNA alleine oder Zugabe keiner DNA zu den Zellen, durchgeführt. Die Anzahl der entstandenen Foci ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Diese Foci sahen hochtransformiert aus.

Die Transformationsrate läßt sich über die Anzahl der Foci, die Plasmidgrößen und die verwendeten DNA Mengen bestimmen. Sie ist zwar, verglichen mit H-1, für huH-4, huH-4/3 und huH-4/9 um eine Größenordnung niedriger, liegt aber deutlich über den Spontan-Werten. Daraufhin wurden je 6 Foci aus den Versuchen mit huH-4, huH-4/3 und huH-4/9 mittels Klonierungszyylinder isoliert und in kleinen Kulturflaschen bis zur Konfluenz hochgezogen. Diese, morphologisch transformiert aussehenden Zellklone wurden auf die Anwesenheit humaner und viraler DNA getestet. Dazu wurde mittels Radioimmunist die HBsAg Expression im Medium gemessen, und in einer slot blot Analyse (siehe D 2.8.2) je 5 µg der zuvor isolierten

DNA aus diesen Foci gegen ^{32}P -markierte Cosmid DNA hybridisiert.

Tabelle 5: Foci-Bildung nach Transfektion in NIH 3T3 Zellen

Transfizierte DNA	μg	3T3 Foci nach 17 Tagen
huH-4	10	12
huH-4/3	10	11
huH-4/9	10	13
H-1	0,5	≈ 50
ohne DNA		0
nur KT-DNA		0
pHC 79	10	0

Da jedoch im Überstand der isolierten Zellklone HBsAg nicht nachweisbar war, und die DNA aus diesen Foci weder HBV Sequenzen noch humane Sequenzen aus der transfizierten DNA enthielt, handelt es sich bei diesen Foci anscheinend doch um Spontantransformatanten. Die Cosmidklone sowie die parentale Zelllinie können also 3T3 Zellen offensichtlich nicht transformieren.

Da es Onkogene gibt, wie z.B. myc, die NIH 3T3 Zellen nicht transformieren können, die aber in Nacktmäusen Tumore verursachen, wurde der folgende Versuch durchgeführt. Je 10 μg huH-4/3 und huH-4/9 DNA wurden zusammen mit 130 ng pAG60 DNA, die das Geneticin (G418) Resistenzgen enthält, und 10 μg kT-DNA in NIH 3T3 Zellen kotransfiziert, auf Geneticin resistente Klone in G418 enthaltendem Medium (500 μg ml G418) selektioniert und 21 - 23 Tage nach der Transfektion die G418-positiven

Zellklone isoliert. Der Überstand von 4 von 6 dieser Klone war im RIA HBsAg positiv. Eine slot blot Analyse der, aus den vier HBsAg positiven Kolonien, isolierten DNA mit ^{32}P -markierter Cosmid DNA (nicht gezeigt) bestätigte die Anwesenheit der transfizierten DNA in diesen Zellklonen. 2×10^7 Zellen des huH-4/3 DNA enthaltenden Zellklons 3T3 1/6, der morphologisch am stärksten transformiert aussah, wurden subkutan in eine Balb c nu/nu Maus injiziert. Da auch nach 3 Monaten noch keine Tumorbildung in der Nacktmaus eintrat, scheint zumindest huH-4/3 auch in vivo, im Mäusesystem, nicht onkogen zu wirken.

Es wurde daraufhin untersucht, ob auf den Cosmidklonen ein Onkogen vorliegt, das nicht Maus NIH 3T3 Zellen aber u.U. die Fisher rat Zelllinie maligne transformieren kann. Diese Rattenfibroblasten lassen sich von den meisten bekannten Onkogenen nicht transformieren oder schwerer in den malignen Status bringen als die Mauszellen. Die Spontantransformationsrate von Fisher rat Zellen liegt zwar einige Größenordnungen unter der von 3T3 Zellen, dafür ist aber die Transfektionseffizienz dieser Zellen verglichen mit Maus NIH 3T3 Zellen ca. 10 mal niedriger (pers. Mitt., Kurth Roth). Unter den für die NIH 3T3 Zelllinie identischen Versuchsbedingungen wurden Fisher rat Zellen mit den Cosmidklonen huH-4/3 und huH-4/9 transfiziert. Als Positivkontrolle wurden jedoch diesmal 5 μg eines Plasmids, das Maus Polyoma Virus DNA und das exprimierbare HBsAg Gen enthält (Dissertation, Kurth Roth) transfiziert. Auch 6 Wochen nach Transfektion fand in keinem Fall, außer der Positivkontrolle, Focibildung statt. Hierbei entstanden ca. 250 Foci. Diese Foci enthalten tatsächlich die zuvor transfizierte DNA, da nach Abschaben des Foci enthaltenden Zellrasens und Inokulation dieser Zellen in

eine Balb c nu/nu Maus ein Tumor entstand. Im Mäuseserum konnte ferner ein hoher Titer an HBsAg nachgewiesen werden. Die Cosmidklone zeigen also auch im Rattenfibroblasten-System keine transformierende Wirkung.

Die parallel zur Transfektion, unter den für die NIH 3T3 Zelllinie beschriebenen Versuchsbedingungen, durchgeführte Kotransfektion der Cosmid DNA in Fisher rat Zellen führte zu einigen G418-positiven Kolonien. Der Überstand der isolierten Zellklone war im RIA HBsAg positiv. 2×10^7 Zellen des am höchsten HBsAg exprimierenden Fisher rat Zellklons wurden subkutan in die Nacktmaus gespritzt. Analog zum Ergebnis im Mäusesystem, trat auch nach 3 Monaten noch keine Tumorbildung ein.

Es gibt folglich keinen Hinweis darauf, daß die Cosmidklone eine transformierende Sequenz enthalten.

3.6 Nachweis einer Transaktivierungsfunktion der viralen DNA

Da ein cis-Einfluß der integrierten HBV DNA auf benachbarte humane DNA Sequenzen in der huH-4 Zelllinie nicht nachweisbar war, und ein genereller cis-Mechanismus zur Erklärung der HBV assoziierten Onkogenese eher unwahrscheinlich ist, wurden Untersuchungen zum trans-Mechanismus durchgeführt. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, könnte ein Transaktivierungsmechanismus als Modell für die Hepatokarzinogenese in Frage kommen. Der erste Hinweis dazu erbrachte die Expressionsklonierung des HBx Gens. Es konnte gezeigt werden, daß ein HBx Genprodukt eine transaktivierende Funktion ausübt (Siddiqui, 1987; Wollersheim, 1987). Das HBx Genprodukt konnte sowohl unter der Kontrolle des frühen SV40 Promoters als auch unter der Kontrolle des homologen HBs Promoters (Zahm, 1987) exprimiert werden. Aufgrund

des Befunds, daß im Serum einiger Patienten mit PLC anti-HBxAg Antikörper nachgewiesen werden konnten (Moriarty, '88), könnte auch in vivo ein trans-Effekt des HBV auf zelluläre Sequenzen eine Rolle spielen. Eine Deregulation zellulärer Promotoren durch ein transaktivierendes, HBV kodiertes Genprodukt könnte, über eine veränderte Expression der entsprechenden humanen Gene, zur malignen Transformation beitragen. Das HBx Gen könnte in hepatorezellulären Karzinomen allerdings nur von integrierten HBV DNA Sequenzen exprimiert werden, da in diesen Tumoren praktisch keine freie HBV DNA vorkommt. M. Wollersheim aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß zwei aus einem PLC klonierte HBV DNA Integrate, die über HBx Gensequenzen verfügen, eine transaktivierende Funktion ausüben.

Die Kartierung der viralen DNA der huH-4 Zelllinie ergab, daß ein komplettes HBx Gen vorliegt. Es sollte nun untersucht werden, ob die oben beschriebene Transaktivierungsfunktion in dem huH-4 HBV DNA Integrat konserviert ist. Außerdem soll durch die Verwendung der Plasmide psub a und psub b geprüft werden, ob diese transaktivierende Funktion, falls vom HBV Integrat ausgeht, tatsächlich vom HBx Gen abhängt. psub a und psub b enthalten kein funktionsfähiges HBx Gen. Zum Nachweis der Transaktivierung wurde der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Assay (siehe D 2.16) verwendet. Dieser Test beruht auf dem Nachweis von CAT Aktivität in kultivierten, eukaryotischen Zellen nach Transfektion eines Plasmids, in welchem das bakterielle CAT Gen unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters steht. Diese CAT Aktivität wird gemessen durch die Umsetzung von exogen zugegebenen ^{14}C -markiertem Chloramphenicol zu den mono- und diacetylierten Derivaten und ist direkt korrelierbar mit der Expressionsrate. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie,

wobei die verschiedenen Derivate des ^{14}C -Chloramphenicols aufgetrennt und im Autoradiogramm sichtbar gemacht werden. Der prozentuale Anteil acetylierten Chloramphenicols wird errechnet.

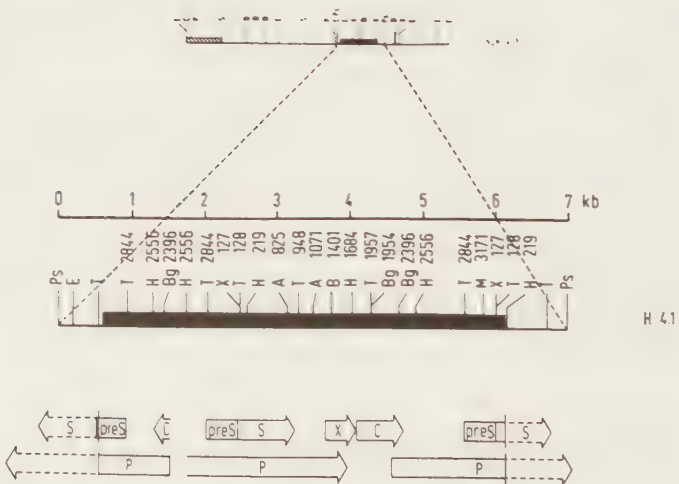
Durch die Kotransfektion eines CAT Plasmids (Indikatorplasmid) mit einem Testplasmid, das einen Transaktivator kodiert wird die Expression des CAT Gens in trans stimuliert. Dies drückt sich in einem höheren prozentualen Anteil an ^{14}C -markiertem, acetyliertem Chloramphenicol aus. Die prozentuale Acetylierung nach Transfektion des Indikatorplasmids alleine wird auf 1 normiert, die prozentuale Acetylierung nach Kotransfektion darauf bezogen und als Transaktivierungs-Faktor bezeichnet. Als Indikatorplasmide wurden pSV2cat, in welchem das CAT Gen unter der Kontrolle des frühen SV40 Promoters und Enhancers exprimiert wird, und pcat2n, welches nur den frühen SV40 Promoter vor dem CAT Gen trägt, verwendet. Alle mit dem CAT Assay erhaltenen Ergebnisse wurden, aufgrund möglicher Schwankungen in der Transfektionseffizienz einzelner Ansätze, mindestens zweimal reproduziert.

Um zu überprüfen, ob bei der Transaktivierung spezifische zelluläre Faktoren beteiligt sind, wurde die dem CAT Aktivitätstest vorangehende Transfektion mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt.

3.6.1 Transaktivierung durch den Subklon pH4.1

Um den möglichen Einfluß zellulärer Sequenzen im Zusammenhang mit der transaktivierenden Funktion von HBV einzuschränken, sollte die integrierte HBV DNA Sequenz nur von kurzen, humanen DNA Stücken flankiert sein. Daher wurde huH-4/3 DNA mit PstI verdaut (siehe 3.2.2), die entstandenen Fragmente auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und das, als H4.1 bezeichnete, 7 kb

PstI HBV DNA Fragment geleluert. Eine PstI Schnittstelle von H4.1 wurde bereits durch die Restriktionskartierung von Subfragment b bestimmt (Abb. 16); sie liegt 0,9 kb von der rechten viralen/humanen Übergangsstelle entfernt. Aufgrund der Größe von 7 kb muß die andere PstI Stelle von H4.1 0,6 kb von der linken viralen/humanen Übergangsstelle entfernt lokalisiert sein (Abb. 22).



Genetic organization of the integrated HBV DNA sequence in huH-4 hepatoma cells

A. Acc I	C. Cla I	M. Mst II	P. Pvu I	Xb. Xba I
B. Bam HI	E. Eco RI	N. Nco I	S. Sal I	X. Xho I
Bg. Bgl II	H. Hinc II	Ps. Pst I	T. Taq I	

Abb. 22: Restriktionskarte und genetische Organisation von H4.1

Die Restriktionskarte des 7 kb PstI HBV DNA Fragments H4.1 ist oben dargestellt. Darunter ist die genetische Organisation von H4.1 hinsichtlich des HBV Genoms (Subtyp adr) wiedergegeben. Das komplette X-Gen, die zugehörigen Promotoren und das, im C-Gen liegende, poly(A) Signal sind offensichtlich vorhanden.

H4.1 enthält ein komplettes X-Gen sowie den für die Transkription notwendigen dazugehörigen Promoter und das poly(A)-Signal. Die humanen DNA Sequenzen sind mit 0,6 kb links und 0,9 kb rechts des HBV DNA Integrates relativ kurz. H4.1 wurde in einem CIP-behandeltem, PstI restringiertem pUC 19-Vektor subkloniert. Das resultierende Plasmid pH4.1 wurde zusammen mit dem Indikatorplasmid pSV2cat oder pcat2n in unterschiedlichen molaren Verhältnissen in die humane Leberzelllinie CCL13 kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pUC 19 anstelle von pH4.1 verwendet. Als Referenzwert wurde das entsprechende Indikatorplasmid alleine transfiziert. Die Auswertung des CAT-Aktivitätstests (Abb. 23; Tab. 6; d, i, n) ergab, daß pH4.1 die CAT Genexpression maximal um einen Faktor von 56 stimulieren kann. Im Zusammenhang mit den Experimenten von P. Zahm und M. Wollersheim aus unserer Arbeitsgruppe kann bei dieser Stimulation der CAT Genexpression von einem Transaktivierungsphänomen ausgegangen werden. Da die Negativkontrollen mit Vektor DNA (a, f, k), innerhalb der Fehlergrenzen des CAT Systems, zu keiner Transaktivierung führten, kann die Stimulation der Expression des CAT Gens nur durch H4.1 verursacht worden sein. Die, innerhalb der Fehlergrenzen des CAT Systems, lineare Abhängigkeit zwischen Gendosis (molare Überschüsse 2 und 9fach in den Ansätzen e, f, i, j, k, n) und prozentua-

ler Acetylierung bestätigt, daß die gemessenen Acetylierungen durch pH4.1 hervorgerufen wurden.



Abb. 23: Autoradiogramm der CAT Assays nach Kotransfektion der Indikatorplasmide pcat2n oder pSV2cat mit subklonierten, integrierten HBV DNA Sequenzen in CCL13 Zellen

CAT Assays (s. D 1.16) wurden 48 h nach Transfektion (s. D 2.14) durchgeführt. Je 1 µg des Indikatorplasmids pcat2n wurden mit einem 9fachen molaren Überschuß an pUC19 (Negativkontrolle, a), psub a (b), psub b (c) und pH4.1 (d) DNA transfiziert. Jeweils 1 µg pSV2cat wurden alleine (e, j) oder mit einem 9 bzw. 2fachen molaren Überschuß an pUC19 (Negativkontrolle, f bzw. k), psub a (g bzw. l), psub b (h bzw. m) und pH4.1 (i bzw. n) DNA transfiziert. Die Auswertung der CAT-Aktivitätstests ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Transaktivierungsfaktoren der CAT Genexpression von pcat2n und pSV2cat

Autoradiogramm-Spur (Abb. 23)	Indikator-plasmid	Test-plasmid	MR	% Acetylierung	Faktor
a	pcat2n	pUC19	9	0,27	1
b	pcat2n	psuba	9	0,33	1,2
c	pcat2n	psubb	9	0,35	1,3
d	pcat2n	pH4.1	9	3,1	11,5
e	pSV2cat	-	-	0,9	1
f	pSV2cat	pUC19	9	1,4	1,5
g	pSV2cat	psuba	9	18,7	20,8
h	pSV2cat	psubb	9	17,2	19,1
i	pSV2cat	pH4.1	9	51	56,6
j	pSV2cat	-	-	1,0	1
k	pSV2cat	pUC19	2	1,18	1,2
l	pSV2cat	psuba	2	4,5	4,5
m	pSV2cat	psubb	2	4,1	4,1
n	pSV2cat	pH4.1	2	8,3	8,3

MR = molarer Überschuß an Testplasmid

Die Berechnung der Transaktivierungsfaktoren ist unter D 2.16 beschrieben.

Ein Vergleich der Transaktivierungsfaktoren (Tab. 6) zeigt, daß eine erhöhte Transaktivierung des SV40 Enhancers (Plasmid pSV2cat) im Vergleich zum SV40 Promoter (Plasmid pcat2n) vorliegt. Der Enhancer scheint somit das vorrangige Ziel der Transaktivierung zu sein.

3.6.2 Transaktivierung durch die Subfragmente a und b

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, daß die integrierte HBV DNA Sequenz aus der huH-4 Zelllinie transaktivierend wirkt. Nun sollte untersucht werden, ob diese Transaktivierung tatsächlich vom HBx Gen abhängt, oder ob auch andere Leserahmen auf dem HBV Genom vorhanden sind, welche u.U. eine transaktivierende Funktion ausüben

könnten. Dies wäre in Analogie zum Humanen Immundefizienz Virus (HIV; Sodroski, 1986), das zwei transaktivierende Proteine (das tat-III und das art Protein) kodiert, denkbar.

Die, zur Kartierung der viralen DNA verwendeten, Plasmide psub a und psub b wurden im CAT Aktivitätstest auf eine transaktivierende Funktion hin untersucht. psub a enthält nur 28 bp (Position 1373-1401) vom 5'-Ende des X-Gens (Abb. 22). Es sollte ein, vermutlich von S-Promoter aus startendes, virales/vektorielles Fusionstranskript entstehen, das bis in, zum X-Gen benachbarte, AT-reiche Vektorsequenzen reicht. AT-reiche Vektorsequenzen können als Polyadenylierungssignal fungieren. Von diesem Fusionstranskript könnte dann ein "Protein", das 9 N-terminale AS der X-Region enthält, translatiert werden. Diese 9 AS wären jedoch kaum für den beobachteten Transaktivierungseffekt verantwortlich zu machen. Das Plasmid psub b enthält bis auf die ersten 28 bp von 5'-Ende das komplette X-Gen (Position 1401-1817), das aber aufgrund eines fehlenden Promoters nicht exprimiert werden kann. In beiden Plasmiden werden also vermutlich keine HBx Sequenzen exprimiert, die einen möglichen Transaktivierungseffekt von psub a und psub b erklären könnten.

p_{cat}2n oder pSV2cat DNA wurde zusammen mit einem unterschiedlichen molaren Überschuß der Testplasmide psub a und psub b in humane Leberzellen CCL13 kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor anstelle von psub a und psub b eingesetzt. Die Transfektion des Indikatorplasmids pSV2cat alleine wurde als Referenzwert genommen. Die Ergebnisse der CAT Assays sind in Abb. 23 und Tabelle 6 dargestellt. Beide Testplasmide transaktivieren, wenn auch um den Faktor 2 bis 3 schwächer als pH4.1, die CAT Genexpression von pSV2cat (Spuren g, h,

l, m). Der Transaktivierungseffekt ist jedoch zu niedrig, um die CAT Genexpression von pcat2n zu stimulieren (Spuren b, c). Dies bestätigt die bereits in Kap. 3.6.1 getroffene Aussage, daß der SV40 Enhancer das vorrangige Ziel der Transaktivierung zu sein scheint. psub a und psub b stimulieren die CAT Genexpression von pSV2cat maximal um einen Faktor von 20. Die Negativkontrollen mit Vektor DNA (Spuren a, f, k) zeigten, verglichen mit den Referenzwerten, keine sichtbare Acetylierung. Auch in diesem Experiment besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen Gendosis (molare Überschüsse 2 und 9fach in den Ansätzen g, h, l, m) und prozentualer Acetylierung. Dies bestätigt, daß die gemessenen Acetylierungen durch psub a und psub b hervorgerufen wurden. Interessanterweise sind die Transaktivierungsfaktoren von psub a und psub b vergleichbar hoch, was auf einen gemeinsamen Transaktivator schließen läßt. Es ist relativ unwahrscheinlich, daß die unterschiedlichen, kurzen, zum HBV Integrat flankierenden, humanen DNA Sequenzen einen gleich großen Transaktivierungseffekt ausüben. Daher wird dieser Transaktivator wahrscheinlich von einem, beiden Subfragmenten gemeinsamen, HBV Leserahmen kodiert. Somit existieren vermutlich, in Analogie zum HIV, zwei transaktivierende HBV Proteine, das HBxAg und ein weiteres, unbekanntes Protein.

3.6.3 Die transaktivierende Funktion in unterschiedlichen Zelllinien

Alle bisherigen Experimente wurden in einer humanen Leberzelllinie durchgeführt, da HBV eine strikte Wirts- und Gewebespezifität besitzt, welche eine Interaktion des HBV mit zellulären Faktoren impliziert.

Um festzustellen, ob die beobachtete Transaktivierung von zellulären Faktoren abhängig ist, wurde die Stimu-

lation der CAT Genexpression von pSV2cat nach Kotransfektion eines 9fachen molaren Überschusses der Plasmide pH4.1, psub a und psub b in verschiedene Zelllinien gemessen. Es wurden die humane Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa, die Affennieren-Zelllinie Vero und die Maus NIH 3T3 Zelllinie verwendet. Als Negativkontrolle wurde wiederum pUC19 anstelle von pH4.1, psub a bzw. psub b verwendet. Die Transfektion von pSV2cat alleine diente als Referenzwert. Die Auswertung der CAT Assays (Abb. 24, Tab. 7) ergab, daß alle drei Testplasmide (c, d, e) einen Transaktivierungseffekt auch in nichthepatischen, menschlichen Zellen (HeLa) ausüben. Dieser Effekt ist um ca. den Faktor 2,5 kleiner als in humanen Leberzellen (vgl. Tab. 6; g, h, i) und reduziert sich nochmals um einen Faktor von maximal 3 in nicht-hepatischen Affenzellen (Vero; c, d, e). Die Transaktivierung in den Mausfibroblasten lag im Falle der Testplasmide psub a und psub b (c, d) nur im Bereich des Negativkontrollwertes, wohingegen mit pH4.1 ein sehr kleiner Transaktivierungsfaktor von 3 erzielt wurde.

Tabelle 7: Transaktivierungsfaktoren der CAT Genexpression von pSV2cat

Autoradio- gramm-Spur (Abb. 24)	Indikator- plasmid	Test- plasmid	% Acetylierung			Faktor		
			HeLa	Vero	3T3	HeLa	Vero	3T3
a	pSV2cat	-	0,07	0,15	0,008	1	1	1
b	pSV2cat	pUC19	0,08	0,28	0,012	1,1	1,8	1,5
c	pSV2cat	psuba	0,49	0,68	0,012	7	4,5	1,5
d	pSV2cat	psubb	0,63	0,56	0,019	9	3,7	2
e	pSV2cat	pH4.1	1,62	1,26	0,025	23,1	8,1	3,1

Die Berechnung der Transaktivierungsfaktoren ist unter D 2.16 beschrieben.

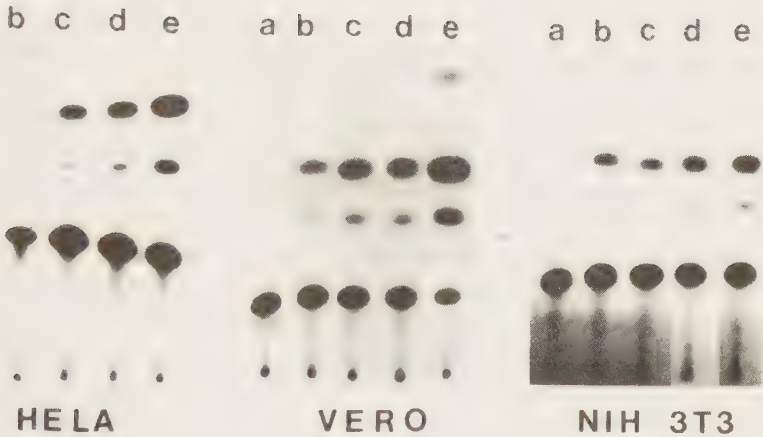


Abb. 24: Autoradiogramm der CAT Assays nach Kotransfektion von pSV2cat mit subklonierten, integrierten HBV DNA Sequenzen in HeLa, Vero und NIH 3T3 Zellen

CAT Assays (s. D 2.16) wurden 48 h nach Transfektion (s. D 2.14) durchgeführt. Je 1 µg des Indikatorplasmids pSV2cat wurden alleine (a) oder mit einem 9fachen molaren Überschuß an pUC19 (Negativkontrolle, b) psub a (c), psub b (d) und pH4.1 (e) in HeLa-, Vero- und Maus NIH 3T3-Zellen transfiziert. Die Auswertung der CAT-Aktivitätstests ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Somit beeinflussen offensichtlich zelluläre Faktoren aus Primaten die Transaktivierung durch sowohl das HBx Genprodukt als auch durch den zweiten, nicht näher charakterisierten Transaktivator.

3.7 Zwischenzusammenfassung

Die Ergebnisse der Kapitel 3.5 und 3.6 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die Cosmidklone huH-4/3 und huH-4/9 besitzen kein onkogenes Potential,
- 2) die klonierte, integrierte HBV DNA Sequenz, die ein komplettes HBx Gen enthält, wirkt transaktivierend auf den frühen SV40 Promoter (und Enhancer). Auch Subklone des HBV DNA Integrats, die über keine oder nur sehr kurze exprimierbaren HBx Gensequenzen verfügen, wirken transaktivierend. Offensichtlich gibt es außer dem HBx Genprodukt noch ein weiteres, transaktivierendes Protein. Zelluläre Faktoren beeinflussen die transaktivierende Funktion beider Transaktivatoren.

F. Diskussion

Epidemiologische Daten implizieren einen kausalen Zusammenhang zwischen einer HBV Infektion und dem Entstehen eines primären Leberzellkarzinoms (PLC). Dieser Zusammenhang konnte durch das Auftreten von PLC im Tiermodell nach der Infektion mit Hepadnaviren erhärtet werden. Bis heute konnte jedoch kein allgemeingültiger Mechanismus der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese gefunden werden. In der vorliegenden Dissertation sollte ein Beitrag zum Verständnis des Wirkungsmechanismus von HBV in der Onkogenese geleistet werden. Da Hepatozyten in vitro nicht kultivierbar sind, bilden chirurgisch entnommenes PLC Gewebe und daraus etablierte Zelllinien das Ausgangsmaterial für die molekularbiologische Analyse des onkogenen Potentials von HBV. Oft enthalten diese Tumore und Tumorzelllinien mehrere verschiedene integrierte HBV DNA Sequenzen, wobei nicht gesichert ist welche(s) dieser HBV Integrate für die maligne Transformation von Bedeutung sind (ist). Durch Verwendung der humanen Hepatom-Zelllinie huH-4, die nur ein singuläres HBV DNA Integrat enthält, wurde dieses Problem umgangen.

1. Struktur des HBV DNA Integrats

Unter der Annahme, daß der Hepatokarzinogenese eine kooperative Wechselwirkung zwischen viraler und zellulärer DNA zugrunde liegt, erhebt sich zunächst die Frage nach der Intaktheit der integrierten HBV DNA Sequenz.

Der Cosmidklon huH-4/3 enthält das komplette, singuläre HBV DNA Integrat aus der humanen Hepatom-Zelllinie huH-4, welches auf beiden Seiten von humanen DNA Sequenzen

flankiert ist. Dagegen ist in dem mit huH-4/3 überlappenden Cosmidklon huH-4/9, aufgrund einer Sau3A Schnittstelle im HBV Genom, nur ein Teil der integrierten viralen DNA, und flankierende humane DNA nur auf einer Seite vorhanden.

Die Feinkartierung und partielle Sequenzanalyse des kompletten HBV DNA Integrats ergab, daß es aus einer 5,4 kb großen HBV spezifischen DNA Sequenz besteht, die bis auf eine etwa 0,8 kb große Inversion an einem Ende kolinear zum HBV Subtyp adr ist. Da die Inversion im 5'-Teil des P-Gens beginnt, ergibt die integrierte HBV DNA Sequenz jedoch kein intaktes HBV Genom vom Subtyp adr (siehe Abb. 17 und 20). Das RNA Pregenom kann folglich nicht synthetisiert werden. Rearrangements werden oft bei integrierten HBV DNA Sequenzen beobachtet, aber ein kloniertes Integrat aus mehr als einer Einheitslänge eines HBV Genoms (3,2 kb) wurde in der Literatur bisher nur einmal beschrieben (DeJean, 1983). Auf welche Weise ein solches HBV Integrat entstehen kann ist nicht eindeutig geklärt. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre eine homologe Rekombination mehrerer HBV Moleküle im episomalen oder integrierten Zustand.

Alle viralen Gene des HBV Integrates, außer dem P-Gen, sind aufgrund der Restriktionskarten offensichtlich strukturell intakt, obwohl kleinere "frameshift" - oder Punktmutationen in den nichtsequenzierten DNA Bereichen nicht auszuschließen sind. Dies steht im Gegensatz zu integrierter Adenovirus DNA (Gahlmann, 1982), SV40 DNA (Clayton, 1981) und WHV DNA (Ogston, 1982), in welchen die viralen Gene durch z.T. komplizierte DNA Rearrangements oft zerstört sind.

Die Integrationsstellen im viralen Genom konnten durch DNA Sequenzierung der viralen/zellulären Übergangsstellen an den Positionen 33 und 233 lokalisiert werden. Beide Integrationsstellen der HBV DNA liegen in der

"gap"-Region, die 20 - 80 % einer HBV Genomlänge ausmacht (Delius, 1983; Koshy, 1983) und sogar in HBV Molekülen eines Subtyps unterschiedlich lang ist. Dies entspräche der Hypothese, daß HBV DNA oft in der einzelsträngigen "gap"-Region integriert und, daß die Integration in Analogie zur PLC/PRE/5 Zelllinie über den sogenannten "rolling circle"-Mechanismus geschehen könnte (Koch, 1984). Ein anderer "hot spot" für die Integration der viralen DNA stellt nach diesem Mechanismus der "nick" im HBV Genom dar, der sich zwischen den beiden "direct repeats" (DR) befindet. Tatsächlich wird auch in vielen PLCs und davon abgeleiteten Zelllinien eine Integration der viralen DNA in der Nähe der DRs gefunden (DeJean, 1984).

2. Integrationslocus der viralen DNA

Die Nukleotidsequenzierung der rechten viralen/zellulären Übergangsstelle ergab, daß die Integration der HBV DNA in eine, zum Intron 4 der schweren Kette des IgG Gens (Ellison, 1981) homologe DNA Sequenz stattfand. Der IgG Locus befindet sich auf Chromosom 14. In keinem anderen Fall eines klonierten HBV DNA Integrats aus einem PLC oder davon abgeleiteten Zelllinie wurde bisher eine Integration in eine solche humane DNA Sequenz beschrieben. Dies bestätigt die, bezogen auf die humanen DNA Sequenzen am Integrationsort (s. Einleitung), unspezifische Integration der viralen DNA in das zelluläre Wirtsgenom.

Derzeit wird die chromosomale Lokalisation der integrierten HBV DNA Sequenz mittels

- a) in situ Hybridisierung der huH-4 Zelllinie (N. Arnold) und
- b) mit Hilfe einer Hybridisierung von Maus / Mensch

Zellhybriden, unter Verwendung der probes a und b (s. E 3.2.4.1), bestimmt.

Die sequenzierten 32 bp humaner DNA an der linken Übergangsstelle ergaben keine aussagekräftigen Schlüsse aus einer Homologiestudie mit der Nukleinsäure-Datenbank. Dazu war der sequenzierte humane DNA Bereich zu kurz. Da oft Deletionen an der Integrationsstelle auftreten, ist nicht unbedingt zu erwarten, daß auch am linken Ende der integrierten HBV DNA Sequenz Intron 4 homologe DNA Sequenzen vorliegen. Durch die oben erwähnte chromosomale Lokalisation des HBV DNA Integrates erscheint jedoch eine weitere Sequenzierung des humanen DNA Bereichs der linken Übergangsstelle nicht unbedingt erforderlich.

Unter der Annahme, daß der IgG Locus tatsächlich betroffen ist, bleibt die Frage nach der möglichen biologischen Konsequenz dieses Befundes offen. Der IgG Locus wird in Hepatozyten normalerweise nicht exprimiert. Der in 3'-Richtung vom Integrationsort entfernt liegende "heavy chain" Enhancer (Mercola, 1985) könnte durch ein virales Genprodukt aktiviert werden und somit wiederum die Expression viraler Gene erhöhen, womit jedoch der Zusammenhang zur Onkogenese nicht hergestellt wäre. Eine weitere Möglichkeit wäre die Synthese eines viralen IgG-Fusionsprodukts (vgl. E 3.3.2). Unter der Annahme, daß dieses Fusionsprodukt die biologische Funktion des IgG beibehält, bleibt die Relevanz dieses Befundes für die maligne Transformation der huH-4 Zelle fraglich, da die humorale, im Gegensatz zur zellulären (s. B 5.), Immunantwort bei der Pathogenese HBV assoziierter Lebererkrankungen vermutlich keine Rolle spielt.

Es bleibt jedoch eine völlig neuartige biologische Funktion eines solchen Fusionsproduktes zu berücksichtigen.

3. Biologische Aktivität der integrierten HBV DNA Sequenz

3.1. Expression viraler Gene

Aufgrund der Restriktionskarte des HBV DNA Integrats sollte das HBs- und das HBc-Gen intakt sein. HBsAg konnte als serologischer Marker im PLC Patienten, von dem die huH-4 Zelllinie etabliert wurde, nachgewiesen werden (Gann, 1981) und sollte demnach auch in vitro auftreten. Durch Radioimmuntests konnte gezeigt werden, daß Maus Ltk⁺-Zellen, die huH-4/3 oder huH-4/9 DNA stabil integriert enthalten, zwar HBsAg aber kein HBc/eAg exprimieren.

Von etwaigen Punktmutationen im HBc Gen abgesehen, kann das HBcAg Gen stumm, aber strukturell intakt sein. Hierbei wird in erster Linie eine Methylierung des C-Gens diskutiert, welche für das HBcAg Gen in PLC/PRF/5 Zellen nachgewiesen werden konnte (Miller, 1983). Es konnte gezeigt werden, daß in PLC/PRF/5 Zellen das HBcAg unter veränderten Kulturbedingungen wie Zucht in Nacktmäusen (Koshy, 1984) oder in Anwesenheit von 5'-Azacytidin (Yoakum, 1983) induzierbar ist. Wie bereits in der Einleitung diskutiert (s. B 5.) selektioniert das Immunsystem auf Hepatozyten die kein HBcAg auf ihrer Oberfläche präsentieren, da diese von zytotoxischen T-Zellen nicht erkannt werden können. Durch Methylierung des C-Gens könnte somit eine persistierende HBV Infektion ausgelöst werden.

Das HBx Gen sollte aufgrund der Restriktionsanalyse ebenfalls intakt sein. Eine im CAT Aktivitätstest nachgewiesene, möglicherweise vom HBx Genprodukt ausgeübte, Transaktivierungsfunktion des HBV DNA Integrates wird in Kap. 3.3 diskutiert.

Infektiöse Virionen können von der huH-4 Zelllinie nicht synthetisiert werden, da kein vollständiges P-Gen vorhanden ist, und somit das RNA Pergenom nicht exprimiert werden kann. Dies steht in Übereinstimmung mit allen bisher untersuchten PLCs und den davon abgeleiteten Tumorzelllinien.

3.2. cis-Effekte der HBV DNA

Ein genereller cis-Mechanismus zur Erklärung der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese (s. B 8.1) gilt, aufgrund der unspezifischen Integration der viralen DNA, als eher unwahrscheinlich.

Dennoch könnte ein cis-Effekt des HBV in Einzelfällen eine Rolle bei der malignen Transformation des Hepatozyten spielen, zumal oft nicht alle Kopien der in einem PLC oder einer PLC-Zelllinie enthaltenen integrierten HBV DNA Sequenzen analysiert wurden. Alle in der Literatur beschriebenen HBV DNA Integrate wurden zudem im Lambdaphagen-System kloniert, womit nur relativ kurze, zur viralen DNA flankierende, humane DNA Bereiche kloniert werden konnten. Ein mit der viralen DNA im Zusammenhang stehendes Onkogen konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Lediglich eine in den *erbA* Locus integrierte HBV DNA Sequenz wurde beschrieben (DeJean, 1986). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß mögliche in die Onkogenese involvierte Onkogene außerhalb der klonierten humanen DNA Bereiche lagen. Um dieses Problem zu klären wurde eine weitere humane Hepatom-Zelllinie, die als huH-4 bezeichnet wird, im Cosmid-system kloniert. Mit Hilfe dieses Systems konnten große Abschnitte humaner DNA in Nachbarschaft zum HBV Integrat auf die Anwesenheit einer transformierenden Sequenz untersucht werden.

In insgesamt 53,5 kb klonierter, humaner, zum HBV Integrat flankierender DNA konnten, durch Hybridisierung, keine DNA Sequenzen von neunzehn getesteten Onkogenen nachgewiesen werden. Versuche mit den fehlenden Onkogenen, inzwischen sind ca. 35 derartige Gene bekannt, stehen noch aus. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Cosmidklone weder in vitro, im Maus NIH 3T3 System und in Fisher rat Zellen, noch in vivo, in der Nacktmaus, transformierend wirken. Interessanterweise wirkt auch die genomische DNA aus der huH-4 Zelllinie im Gegensatz zu anderen PLC DNA's wie PLC/PRF/5 DNA im 3T3 System nicht transformierend. Es ist somit fraglich, ob ein Onkogen bei der malignen Transformation der huH-4 Zelle beteiligt war. Die Anwesenheit einer transformierenden Sequenz in Nachbarschaft zur integrierten HBV DNA kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, denn abgesehen von technischen Mängeln, ist möglicherweise ein Onkogen am neoplastischen Prozess beteiligt, das weder im Maussystem noch in Rattenfibroblasten maligne transformierend wirkt. Dabei könnte es sich um ein bekanntes, aber noch nicht getestetes, oder um ein völlig neuartiges Onkogen handeln. Die Methode der Wahl, das onkogene Potential der huH-4 Zelllinie sowie der daraus klonierten Fragmente zu überprüfen, wäre jedoch ein in vitro System aus primären humanen Hepatozyten, das derzeit leider noch nicht zur Verfügung steht. Zusammengefaßt, liefern diese Daten keine Evidenz für einen cis-Einfluß des HBV auf benachbarte humane DNA Abschnitte.

3.3. trans-Effekte der viralen DNA

Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß das HSV X-Gen, kloniert in einen Expressionsvektor (unter der Kontrolle des frühen SV40 Promoters), eine transaktivierende Funktion auf den frühen SV40 Promoter (und Enhancer) ausübt (Siddiqui, 1987; Wollersheim, 1987). Das HBx Genprodukt kann auch unter der Kontrolle des homologen HBs Promoters exprimiert werden (Zahm, 1987). Eine frameshift Mutation im X-Gen führt zum Verlust der transaktivierenden Funktion (Twu, 1987).

Es konnte mittels des Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Aktivitätstests gezeigt werden, daß eine transaktivierende Funktion in der integrierten HBV DNA Sequenz der huH-4 Zelllinie (Subklon pH4.1) erhalten ist. Der Subklon pH4.1 verfügt über ein komplettes HBx Gen sowie über die zugehörigen Transkriptionselemente (HBx Promoter, Enhancer). Nach Kotransfektion von pH4.1 mit dem Indikatorplasmid pSV2cat (CAT Gen unter Kontrolle des frühen SV40 Promoters und Enhancers) oder pcat2n (CAT Gen unter Kontrolle des frühen SV40 Promoters) in die humane Hepatozyten-Zelllinie CCL13 stieg die CAT Genexpression um über fünfzigfach verglichen mit der Negativkontrolle (Vektor anstelle von pH4.1). In Analogie zur Expressionsklonierung des HBx Gens ist offensichtlich das HBx Genprodukt für die Transaktivierung der integrierten HBV DNA Sequenz verantwortlich zu machen. Ein Beweis hierfür könnte durch die Deletion des X-Gens erbracht werden, wonach der Transaktivierungseffekt abnehmen sollte.

Schwieriger zu erklären als die HBx-abhängige Transaktivierung von pH4.1 ist jedoch die transaktivierende Funktion der beiden HBV Subklone psub a und psub b, da diese kein funktionsfähiges HBx Genprodukt exprimieren

können. Nach Kointransfektion mit dem Indikatorplasmid pSVcat in die Cx13 Zelllinie transaktivierten beide Subklone die CAT Genexpression um den gleichen Faktor, nämlich 29-fach. Die Negativkontrolle (Vektor anstelle von psub a bzw. psub b) führte hingegen zu keiner sichtbaren Acetylierung. In Analogie zum, unabhängig von tatIII Protein, transaktivierenden art Protein des HTLV-III (s. Kap. 3.3.1) läßt sich ein weiteres transaktivierendes HBV Genprodukt postulieren. Da psub a und psub b gleich stark transaktivierend wirken, sollte dieser zweite, hypothetische HBV Transaktivator von beiden Subklonen exprimiert werden und unabhängig von HBV Protein wirken können. In diesem Zusammenhang war von Interesse, ob sich die aufgestellte Hypothese durch die bekannte Strukturverwandtschaft des HBV mit den Retroviren untermauern ließe. Da das art-Gen zwischen den retroviralen Strukturgenen gag und env liegt, welche den HBV Strukturgenen C und S entsprechen, müßte sich ein für den postulierten Transaktivator kodierender ORF zwischen dem HBc- und HBs-Gen finden lassen. Eine, in Zusammenarbeit mit A. v. Zezula durchgeführte, Computeranalyse zeigte tatsächlich nur einen potentiellen ORF in der den beiden Subklonen gemeinsamen HBV Region (vom Ende des C Gens bis zum Ende des preS ORFs) auf, der die Transaktivierung der CAT Genexpression durch die Subklone psub a und psub b erklären könnte. Dieser, am Ende des HBc Gens beginnende, Leserahmen liegt zwischen den Positionen 2419 und 2598 auf dem HBV Genom (im 5. Leseraster) und kodiert für ein hypothetisches, 60 Aminosäuren enthaltendes Protein. Für die Expression dieses Leserahmens müßte ein kryptischer Promotor angenommen werden, da die bekannten HBV Promotoren zu weit entfernt liegen.

Folgende Experimente sollen nun zur Klärung dieser Hypothese beitragen:

- 1) Durch DNA-Sequenzierung des HBV DNA Integrates aus der hnu-4 Zelllinie soll überprüft werden, ob der für den zweiten, hypothetischen HBV Transaktivator kodierende ORF intakt ist.
- 2) Die Expressionsklonierung dieses Leserahmens aus dem HBV Genom soll zeigen, ob das Genprodukt eine transaktivierende Funktion ausüben kann.
- 3) Für die Expression dieses Leserahmens müßte ein weiterer, kryptischer HBV Promoter angenommen werden. Dieser könnte durch Subklonierung von HBV DNA Fragmenten, die über diesen ORF und unterschiedlich lange, 3'-entfernt liegende DNA Sequenzen verfügen, in einen pUC Vektor identifiziert werden.

3.3.1 Mögliche Mechanismen der Transaktivierung und Tumorgenese

Der Mechanismus der Transaktivierung der CAT Genexpression sowohl durch ein HBx Genprodukt als auch durch den postulierten zweiten HBV-Transaktivator ist nicht aufgeklärt:

Theoretisch kann die Transaktivierung durch direkte Wechselwirkung des Proteins mit DNA oder RNA zustandekommen. So transaktiviert z.B. das tat (transactivator of transcription) Protein des humanen T Cell lymphotropen Virus HTLV-I die CAT Genexpression unter Kontrolle des HTLV Long Terminal Repeats (LTR) auf DNA Ebene, durch Interaktion mit Promoter- oder Enhancersequenzen im LTR (Felber, 1985). Das für die Virusreplikation notwendige tatIII Protein des HTLV-III stimuliert dagegen posttranskriptional die HTLV-III LTR kontrollierte Genexpression durch Interaktion mit spezifischen Ziel-

sequenzen auf der viralen RNA (Rosen, 1985). Ein weiteres Genprodukt des HTLV-III, das art (anti-repressor translation) Protein, neutralisiert den Effekt von cis-wirkenden, negativ-regulatorischen Elementen auf der viralen, für die Strukturproteine kodierenden mRNA. Dadurch wird die Translation der "gag" und "env" Proteine, die während der Latenzphase reprimiert sind, post-transkriptional stimuliert (Rosen, 1986; Sodrosky, 1986).

Die Transaktivierung kann theoretisch aber auch indirekt, durch eine Interaktion mit zellulären, regulatorischen Faktoren erklärt werden. Eine Möglichkeit wäre die Inaktivierung zellulärer Repressoren. Das HBx Protein bindet vermutlich eher an zelluläre, regulatorische Proteine als an spezifische DNA Sequenzen. Hierfür gibt es die folgenden Hinweise:

- a) die relativ unspezifische Transaktivierung verschiedener viraler Promotoren wie des frühen SV40-, des Herpes Simplex Virus-I Thymidin kinase-Promoters sowie der LTRs von HTLV-I und Rous Sarcoma Virus (Zahm, 1987),
- b) die zytoplasmatische Lokalisierung des HBx Proteins in COS Zellen, die mit einem HBx Expressionsplasmid transfiziert worden waren (Siddiqui, 1987),
- c) die abnehmenden Transaktivierungsfaktoren für pH4.1 mit abnehmender phylogenetischer Verwandtschaft der transfizierten Zelllinien Hela, Vero und 3T3 mit den humanen Leberzellen CCL13 nach Kotransfektion mit dem Indikatorplasmid pSV2cat. Dieser Sachverhalt konnte auch für psub a und psub b sowie für klonierte, genomische HBV DNA nachgewiesen werden (Zahm, 1987). Dies impliziert, daß es sich um eine Interaktion des HBx Genproduktes bzw. des postulierten zweiten Transaktivators mit einem, für humane Hepa-

tozyten relativ spezifischen zellulären Faktor handeln könnte.

Durch die Bindung des HBx Proteins bzw. des postulierten zweiten transaktivierenden HBV Proteins an ein solches zelluläres Protein könnte dessen Affinität oder Spezifität für bestimmte Promoter- oder Enhancer-Sequenzen eines zellulären Gens verändert werden. Dadurch könnte die Expression dieses zellulären Gens aktiviert oder reprimiert werden.

Die Transaktivierung der Expression von zellulären Genen, die eine Funktion in der Stoffwechselregulation oder in der Zellzykluskontrolle besitzen, kann zur De-regulation und damit malignen Transformation der Zelle führen. Nach einem Modell der Zellzykluskontrolle eukaryotischer Zellen von Heldin (1984) wird die Proliferation normaler Zellen durch exogene Wachstumsfaktoren kontrolliert. Wird die Zelle von dieser Regulationskontrolle unabhängig, so kann sie unkontrolliert proliferieren. Dieser als Immortalisation bezeichnete Prozess stellt den ersten Schritt zur malignen Transformation dar. Ausgelöst werden kann dieser Prozess durch die konstitutive Expression von Onkogenen oder Onkogen verwandten Sequenzen:

- a) die für endogene Wachstumsfaktoren kodieren. So kodiert z.B. das sis Onkogen des Simian Sarcoma Virus (SSV) für das p24^{sis} Onkogenprotein, das mit dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) strukturell identisch ist. Die mit SSV infizierte Zelle wird durch die konstitutive Expression von p24^{sis} unabhängig von extrazellulär vorhandenem PDGF und kann so, durch Bindung an PDGF-Rezeptoren, die Zelle zur Proliferation anregen (Johnsson, 1984). Für das 12S Genprodukt des E1A Gens von Adenovirus 5 konnte gezeigt werden, daß mit diesem Virus infizierte primäre Epithelzellen einen Wachstumsfaktor synthetisie-

ren, der die DNA Synthese induziert und zur Proliferation der in vitro nicht wachsenden Prä-Erzellen führt (Quinlan, 1987),

- b) die für Wachstumsfaktor-Rezeptoren kodieren. Das erste Onkogen des Avian Erythroblastosis Virus AEV kodiert für ein Protein (pp60^{src}) das zur intrazellulären Domäne des Konformal Growth Factor EGF Rezeptors Homologie aufzeigt. Durch konstitutive Expression von pp60^{src} kann die AEV infizierte Zelle in die Proliferationsphase gebracht werden (Downward, 1984). Ein weiteres Beispiel findet sich bei den tat Proteinen der humanen T-Zell lymphotropen Viren (HTLV-I, II, III). Es konnte gezeigt werden, daß das tatI Protein in HTLV-I infizierten T Zellen die Promotoren des Interleukin-2 (Il-2) Gens und des Il-2R alpha (Interleukin-2 Rezeptor, alpha Kette) Gens durch Transaktivierung stimuliert (Cross, 1987). Durch die konstitutiv erhöhte Expression von Il-2 und des dazugehörigen Rezeptors werden die virusinfizierten Zellen von dem extrazellulären T-Zell spezifischen Wachstumsfaktor Il-2 unabhängig. Die dadurch bedingte autokrine Proliferation der Zellen stellt die erste Stufe zur HTLV-I induzierten Leukämogenese dar,
- c) die das intrazelluläre System, das zur Initiation der DNA Synthese und zur Zellteilung führt, "ankurbeln". Das c-myc Onkogen kodiert für ein transaktivierendes, Nukleus-assoziiertes Protein das vermutlich die Expression zellulärer Gene, welche die Zellproliferation kontrollieren, reguliert. In PLCs von, mit WHV chronisch infizierten woodchucks konnte in einigen Fällen eine erhöhte c-myc Genexpression nachgewiesen werden (Möröy, 1986). Dieser Befund wurde für HBV bestätigt: das c-myc mRNA "level" stieg nach stabiler Transfektion eines HEX Expres-

sionsplasmids in NIH 3T3 Zellen um bis zu fünfzigfach (pers. Mitt., Koike). Ein target Gen der HBx-abhängigen Transaktivierung könnte somit das c-myc Proto-onkogen darstellen. Die Northern Analyse von PLCs und PLC-Zelllinien soll nun zeigen, ob die Expression des c-myc Proto-onkogens erhöht ist.

Die Immortalisation einer Zelle ist ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Ereignis auf dem Wege zur malignen Transformation. Erst nach Überwindung der kontakthinhibition durch benachbarte Zellen und malignes Wachstum einer immortalisierten Zelle ist ihr voll transformierter Status erreicht.

Ist die HBx-abhängige Transaktivierung generell, kausal an der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese beteiligt, so müssen in zumindest einer integrierten HBV DNA Sequenz der meisten PLCs oder PLC Zelllinien das HBx Gen und die von ihm ausgeübte transaktivierende Funktion erhalten sein. Die transaktivierende Funktion konnte tatsächlich in vier weiteren klonierten HBV DNA Integraten in unserer Arbeitsgruppe, die aus zwei verschiedenen primären hepatozellulären Karzinomen (pers. Mitt. W. Caselmann, M. Wollersheim) und zwei unterschiedlichen PLC Zelllinien (huH-1, pers. Mitt. C. Kaltschmidt; pAl-10.7 aus der PLC/PRF/5 Zelllinie) stammen, nachgewiesen werden, wobei in allen Fällen X-Gensequenzen vorhanden sind.

Aufgrund der langen Latenzzeit zwischen der HBV Infektion und dem Entstehen eines PLC wird angenommen, daß ein HBx Genprodukt nicht transformierend, sondern eher immortalisierend wirkt und, daß zur malignen Transformation der infizierten Zelle noch ein zusätzlicher Faktor wie z.B. Aflatoxin oder Alkohol notwendig ist.

Der postulierte zweite HBV Transaktivator, der die transaktivierende Funktion der beiden Subfragmente psuB

a und psub b erklären könnte, besitzt vermutlich keine generelle, kausale Bedeutung für die maligne Transformation des Hepatozyten, denn der entsprechende ORF liegt nur in 2 der insgesamt 5 klonierten integrierten HBV DNA Sequenzen aus unserer Arbeitsgruppe vor. Eine Literaturrecherche der Publikationen von 1983-1987 ergab ferner, daß wahrscheinlich nur in 3 von 15 klonierten HBV DNA Integraten aus verschiedenen PLCs und PLC Zelllinien dieser ORF vorkommt, wohingegen in mindestens 90 % dieser Fälle HBx Gensequenzen vorliegen. Die Konservierung dieses, für den zweiten hypothetischen Transaktivator kodierenden, ORFs in den verschiedenen HBV Subtypen impliziert jedoch eine biologische Funktion. So könnte dieser Leserahmen bzw. sein Genprodukt eine Rolle während der Replikation des HBV spielen.

G. LITERATUR

Aaronson SA & Todaro GJ (1968): Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science* 162: 1024-1026

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I & Knowles BB (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615-616

Albin C & Robinson WS (1980): Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* 34: 297-302

Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW & Lecatsas G (1976): Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. J. Med.* 50: 2124-2128

Appleyard RK (1954): Segregation of lambda lysogenicity during bacterial recombination in *E. coli* K12. *Genetics* 39: 429-439

Batley J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G & Leder P (1983): The human c-myc oncogene: Structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34: 779-787

Beasley RP, Lin CC, Hwang LY & Chien CS (1981): Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133

Beasley RP (1982): Hepatitis B virus as the agent in hepatocellular carcinoma: epidemiological considerations. *Hepatology* 2: 21-26

- Beasley PP & Hwang LY (1984): Epidemiology of hepatocellular carcinoma, In Viral Hepatitis and Liver Disease (Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds) Grune & Stratton, New York: pp. 209-214
- Benton WD & Davis PW (1977): Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-182
- Birnboim HC & Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523
- Bishop JM (1985): Viral oncogenes. Cell: 42: 23-28
- Blum HE, Stowring L, Figus A, Montgomery CR, Haase AT & Vyas GN (1983): Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium and vascular elements by in situ hybridisation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6685-6688
- Blumberg BS & London WT (1980): Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma: relationship of "icrons" to cancer. In Viruses in Naturally Occuring Cancers (Essex M, Todaro G, zur Hausen H eds), Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor: pp. 401-421
- Brechot C, Lugassy C, Dejean A, Pontisso P, Thiers V, Berthelot P & Tiollais P (1984): Hepatitis B virus DNA in infected human tissues, In Viral Hepatitis and Liver Disease (Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds) Grune and Stratton, New York: pp. 395-409
- Broome S & Gilbert W (1985): Rous sarcoma virus encodes a transcriptional activator. Cell 40: 537-546

Cattaneo R, Will H, Hernandez N & Schaller H (1983): Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 305: 336-338

Cattaneo R, Will H & Schaller H (1984): Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* 3: 2191-2196

Caveanee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E & Maumeene I (1985): Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 228: 501-503

Chang C, Jeng KS, Hu CP, Lo SJ, Su TS, Ting LP, Chou CK, Han SH, Pfaff E, Salfeld J & Schaller H (1987): Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. *EMBO J.* 6: 675-680

Chang HK, Chou CK, Chang C, Su TS, Hu CP, Yohida M & Ting LP (1987): The enhancer sequence of human hepatitis B virus can enhance the activity of its surface gene promoter. *Nucl. Acids Res.* 15: 2261-2268

Chang RS (1954): Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 87: 440-443

Chen EJ & Seeburg PH (1985): Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170

Chen P, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B & Taylor J (1986): Structure and replication of the genome of the hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8774-8778

Clarke L & Carbon J (1976): A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell 9: 91-99

Claton CE & Rigby PWJ (1981): Cloning and characterization of the integrated viral DNA from three lines of SV40-transformed mouse cells. Cell 25: 547-559

Colbere-Garapin F, Chousterman S, Horoniceau F, Kourilsky P & Garapin AC (1979): Cloning of the active thymidine kinase gene of Herpes Simplex Virus type 1 in E. coli K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3755-3759

Courouce-Pauty AM, Plancon A & Soulier JP (1983): Distribution of HBsAg subtypes in the world. Vox. Sang. 44: 197-211

Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F & Leonard WJ (1987): Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. Cell 49: 47-56

Dalla-Favera R, Gelmann EP, Martinotti S, Franchini G, Papas TS, Gallo RC & Wong-Staal F (1982): Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6497-6501

Deininger PL, Jolly DJ, Rubin CM, Friedmann T & Schmid CW (1981): Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. J. Mol. Biol. 121: 17-33

Dejean A, Lugassi C, Tiollais P & Brechot C (1984a): Detection of hepatitis B virus DNA in pancreas, kidney, and skin of two human carriers of the virus. *J. Gen. Virol.* 65: 651-655

Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S & Tiollais P (1984b): Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5350-5354

Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik K-H & Tiollais P (1986): Hepatitis B virus DNA integration into a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 332: 70-72

Dejean A, Brechot C, Tiollais P & Wain-Hobson S (1983): Characterization of integrated hepatitis B viral DNA cloned from a human hepatoma and the hepatoma derived cell line PLC/PRF/5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2505-2509

Dienstag JL (1984): Immunologic mechanisms in chronic viral hepatitis. In *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds) Grune & Stratton, New York: pp. 135-166

Delius H, Gough NM, Cameron CH & Murray K (1983): Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* 47(2): 337-343

DeLorbe W, Luciw PA, Goodman HM, Varmus HE & Bishop JM (1980): Molecular cloning and characterization of avian sarcoma virus circular DNA molecules. *J. Virol.* 36: 50-61

Devereux J, Haeberli P & Smithies O (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucl. Acids Res. 12: 387-395

Donner L, Fedele LA, Garon CF, Anderson SJ & Sherr CJ (1982): McDonough feline sarcoma virus: Characterization of the molecularly cloned provirus and its feline oncogene (v-fms). J. Virol. 41: 489-500

Downward J, Warden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J & Waterfield MD (1984): Close similarity of epidermal growth factor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature 307: 521-527

Edman JC, Gray P, Valenzuela P, Rall LB & Rutter WJ (1980): Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. Nature 286: 535-538

Eisenburg J (1982): Die Virus-induzierten Lebererkrankungen beim Menschen. Naturwissenschaften 69: 585-593

Elfassi E, Romet-Lemonne JL, Essex M, France-Mclane M & Hasletine WA (1984): Evidence of extrachromosomal forms of hepatitis B viral DNA in a bone marrow culture obtained from a patient recently infected with Hepatitis B Virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3526-3528

Ellis RW, DeFeo D, Maryak JM, Young HA, Shih TY, Chang EH, Lowy DR & Scolnick EM (1981): Dual evolutionary origin for the rat genetic sequences of Harvey murine sarcoma virus. J. Virol. 36: 408-420

Ellison J, Buxbaum J & Hood L (1981): Nucleotide sequence of a human Immunoglobulin C_{gamma4} gene. DNA 1: 11-18

El Karez A, Murphy ATM, Fichter T, Efstratiadis A & Silverstein S (1985): Transactivation control signals in the promoter of the herpesvirus thymidine kinase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1002-1006

Farza H, Salmon AM, Hadchouel M, Moreau JL, Babinet C, Tiollais P & Poucel C (1987): Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1187-1191

Feitelson MA, Millman I, Halbherr H, Simmons H & Blumberg BS (1986): A newly identified hepatitis B type virus in tree squirrels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2233-2237

Freytag von Loringhoven A, Koch S, Hofschneider PH & Koshy R (1985): Co-transcribed 3' host sequences augment expression of integrated hepatitis B virus DNA. EMBO J. 4: 249-255

Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N & Matsubara K (1983): Cloning and structural analysis of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. Nucl. Acids Res. 11: 4601-4610

Gahlmann R, Leisten R, Vardian L & Doerfler W (1982): Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. EMBO J. 1(9): 1101-1104

Galibert F, Mandart E, Fittousi F, Tiollais P & Charnay P (1979): Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281: 646-650

Ganem D & Varmus HE (1987): The molecular biology of the hepatitis B virus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 651-693

Gelmann EP, Petri E, Cetta A & Wong-Staal F (1982): Deletions of specific regions of the simian sarcoma-associated virus genome are found in defective viruses and in the simian sarcoma virus. *J. Virol.* 41: 593-604

Gerber MA & Thung SN (1985): Molecular and cellular pathology of hepatitis B. *Lab. Invest.* 52(6): 572-590

Gerlich WH & Robinson WS (1980): Hepatitis B virus contains a protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21: 801-809

Gerlich WH, Goldmann U, Müller R, Stibbe W & Wolff W (1982): Specificity and localization of the hepatitis B virus associated protein kinase. *J. Virol* 42: 761-766

Gey GO, Coffman WD & Kubicek MT (1952): *Cancer Res.* 12: 264

Glaser T, Lewis WH, Bruns GA, Watkins PC & Rogler CE (1986): The β -subunit of follicle-stimulating hormone is deleted in patients with aniridia and Wilms' tumor, allowing a further definition of the WAGR locus. *Nature* 321: 882-886

German CM, Moffat LF & Howard BH (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044-1051

Joseph NM (1983): Core and e antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs. *J. Mol. Biol.* 165: 683-699

Graham FL & van der Eb AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology* 52: 456-467

Hadziyannis SJ, Liebermann HM, Karvountzis GG & Shafritz DA (1983): Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication and hepatitis B viral DNA in liver and serum of HBcAg vs. anti-HBeAg positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 3: 656-662

Hadler S (1984): Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 315: 210-214

Hansen MF, Koufos A, Gallie B, Philips RA & Fodstad O (1985): Osteosarkoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6216-6220

Hayward WS, Neel BG & Astrin SM (1981): Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290: 475-480

Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H & Gerlich WH (1984): Large surface proteins of

hepatitis B virus containing the core sequence.
J.Virol. 52: 396-402

Heldin C-H & Westermark B (1984): Growth factors: Mechanisms of action and relation to oncogenesis. Cell 37: 9-20

Hess G, Arnold W & Meyer zur Horstfeldt P-H (1981): Hepatitis B virus associated deoxyribonuclease and polymerase. A partial characterization by the use of chemical agents. Klin. Wschr. 59(12): 691-697

Hess JL, Clements JE & Narayan O (1985): Cis and trans-acting transcriptional regulation of visna virus. Science 229: 482-485

Hohn B (1979): In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. Methods Enzymol. 68: 299-309

Hohn B & Collins J (1980): A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 11: 291-296

Hoofnagle JH & Alter H (1984): Chronic viral hepatitis. In Viral Hepatitis and Liver Disease: (Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds) Grune & Stratton, New York: pp. 97-113

Huh N & Utakoji T (1981): Production of HBs antigen by two new human hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. Gann 72: 178-179

Jameel S & Siddiqui A (1986): The human hepatitis B virus enhancer requires trans-acting cellular factor(s) for activity. Mol. Cell. Biol. 6: 710-715

Johnsson A, Heldin C-H, Wasteson A, Westermark B, Deuel TF, Huang JS, Seeburg DH, Gray E, Ullrich A, Scrace G, Stroobant P & Waterfield MD (1984): The c-sis gene encodes a precursor of the B-chain of platelet derived growth factor. EMBO J. 3: 921-928

Kam W, Rall L & Schmid R (1982): State of hepatitis B virus in carriers, in acute infection, and in hepatocellular carcinoma. In Viral Hepatitis (Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE eds), Philadelphia, Franklin Institute Press: pp. 809

Kay A, Mandart E, Trepo C & Galibert G (1985): The HBx gene expressed in E. coli is recognized by sera from hepatitis patients. EMBO J. 4: 1287-1292

Kit S, Dubbs D, Piekarski L & Hsu T (1963): Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine. Exp. Cell. Res. 31: 297-312

Kitamura N, Kitamura A, Toyoshima K, Hirayama Y & Yshida M (1982): Avian sarcoma virus Y73 genome sequence and structural similarity of its transforming gene product to that of Rous sarcoma virus. Nature 297: 205-208

Knowles BB, Howe CC & Aden DP (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 209: 497-499

Koch S, von Loringhoven AF, Hofschneider PH & Koshy R (1984): Amplification and rearrangement in hepatoma cell DNA associated with integrated hepatitis B virus DNA. EMBO J. 3: 2185-2189

- Koshy R, Koch S, von Loringhoven A, Kahmann R, Murray K & Hofschneider PH (1983): Integration of hepatitis B virus DNA: evidence for integration in the single-stranded gap. *Cell* 34: 215-223
- Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC & Cavenee WK (1985): Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature* 316: 330-334
- Landers TA, Greenberg HB & Robinson WS (1977): Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J. Virol.* 23: 368-376
- Laub O, Rall LB, Truett M, Shaul Y, Strandring DN, Valenzuela P & Rutter WJ (1983): Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. *J. Virol.* 48: 271-280
- Laure F, Zagury D, Saimot AG, Gallo RC, Hahn BH & Brechot C (1985): Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS or AIDS-related complex.
- Loringhoven AF, Koch S, Hofschneider PH & Koshy R (1985): Co-transcribed 3' host sequences augment expression of integrated hepatitis B virus DNA. *EMBO J.* 4: 249-255
- Lusky M & Botchan MR (1985): Genetic analyses of bovine papilloma virus type I transacting regulating factors. *J. Virol.* 53: 955-965

Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Ito Y, Miyamoto H, Funatsu G, Oda K, Usuda S, Togami S, Nakamura T, Miyakawa Y & Mayumi M (1984): A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-s region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 86: 910

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH & Robinson WS (1980): A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2941-2945

Marion P, Van Davelaar, Knight S, Salazar F & Garcia G (1986): Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4543-4546

Mason WS, Seal G & Summers J (1980): Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36: 829-836

Maynard JE, Berquist KR, Krushak DH & Purcell RH (1972): Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B. *Nature* 237: 514-515

McCoy MS, Toole JJ, Cunningham JM, Chang EH, Lowy DR & Weinberg RA (1983): Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature* 302: 79-81

Mercola M, Goverman J, Mirell C & Calame K (1985): Immunoglobulin heavy chain enhancer requires one or more tissue-specific factors. *Science* 227: 266-270

- Meyerowitz EM, Guild GM, Prestidge LS & Hogness DS (1980): A new cosmid vector and its use. *Gene* 11: 271
- Miller RH & Robinson WS (1983): Integrated hepatitis B virus sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PLC/PRF/5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2534-2538
- Miller RH & Robinson WS (1986): Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2531-2535
- Miller RH (1987): Proteolytic self-cleavage of hepatitis B virus core protein may generate serum e antigen. *Science* 236: 722-725
- Mizusawa H, Taira M, Yaginuma K, Kobayashi M, Yoshida E & Koike K (1985): Inversely repeating integrated hepatitis B virus DNA and cellular flanking sequences in the human hepatoma-derived cell line huSP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 208-212
- Möröy T, Marchio A, Etiemble J, Trepo C, Tiollais P & Buendia M-A (1986): Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis infected woodchucks. *Nature* 324: 276-279
- Moriarty A, Alexander H, Lerner RA & Thornton GB (1985): Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: Serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 227: 429-433
- Neurath AR, Keat SBH, Strick N, Taylor P & Sterus CE (1985): Hepatitis B virus contains pre-S gene encoded domains. *Nature* 315: 154-156

Nishioka K (1982): Hepatitis B subtypes in Asia and ancestors of alaskan natives. *Lancet* 1: 738

Noonan C, Yoffe B, Mansell P, Melnick J & Hollinger FB (1986): Extrachromosomal sequences of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5698-5702

Ogston CW, Jonak GJ, Rogler CE, Astrin SM & Summers J (1982): Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinoma of woodchucks. *Cell* 29: 385-394

Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y & Nishioka K (1983): The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucl. Acids Res.* 11(6): 1747-1757

Orkin SH, Goldman DS & Sallan SE (1984): Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 309: 172-174

Ou J-H & Rutter WJ (1985): Hybrid hepatitis B virus-host transcripts in a human hepatoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 83-87

Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G & Murray K (1979): Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282: 575-579

Perbal B & Baluda MA (1982): Avian myeloblastosis virus transforming gene is related to unique chicken DNA re-

gions separated by at least one intervening sequence. J. Virol. 41: 250-257

Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J & Wigler M (1981): Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. Cell 27: 467-476

Petit MA & Pillot J (1985): HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein p22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. J. Virol. 53: 543-551

Pignatelli M, Waters J, Lever A, Iwarson, Gerety R & Thomas HC (1987): Cytotoxic T-cell response to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. Evidence that antibody modulation may cause protracted infection. J. Hepatology 4: 15-21

Popper H, Gerber MA & Thung SN (1982): The relation of hepatocellular carcinoma to infection with hepatitis B and related viruses in man and animals. Hepatology 2: 1-9

Pourcel C, Louise A, Gerraiss M, Cheuciner N, Dubois MF & Tiollais P (1982): Transcription of the hepatitis B surface antigen in mouse cells transformed with cloned viral DNA. J. Virol. 42: 100-105

Quinlan MP, Sullivan N & Grodzicker T (1987): Growth factor(s) produced during infection with an adenovirus variant stimulates proliferation of non established epithelial cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3283-3287

Rall JB, Standring DN, Lask J & Rutter WJ (1983): Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1766-1773

Robinson WS, Marion PL, Feitelson M & Siddiqui A (1982): The hepadna virus group: hepatitis B and related viruses. In *Viral Hepatitis*, Herausgeber: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE. Philadelphia, Franklin Institute Press: 57-61

Rogler CE, Sherman M, Su CY, Shafritz DA, Summers J, Shows TB, Henderson A & Kew M (1985): Deletion in chromosome 11 p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma. *Science* 230: 319-322

Rosen CA, Sodrosky JG & Haseltine WA (1985): The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLVIII/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41: 813-823

Rosen CA, Sodrosky JG, Goh WC, Dayton AI, Lippke J & Haseltine WA (1986): Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature* 319: 555-559

Ruiz-Opazo N, Chakraborty PR & Shafritz DA (1982): Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: possible implications in persistent HBV infection. *Cell* 29: 129-138

Ruschew K, Hoofnagle JH & Masur HC (1984): Hepatitis B virus markers in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 86: 1226

- Saito J, Oya Y & Shimoto H (1986): Novel RNA family structure of hepatitis B virus expressed in human cells, using a helper-free adenovirus vector. *J. Virol.*: 554-560
- Sanger F, Nicklen B & Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sassone-Corsi P, Wildman A & Charnon P (1983): A trans-acting factor is responsible for the simian virus 40 enhancer activity in vitro. *Nature* 313: 458-463
- Schmid CW & DeLencik WP (1982): The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216: 1065-1070
- Seeger C, Ganem D & Varmus HE (1986): Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232: 477-484
- Shafritz DA & Fogler CE (1984): Molecular characterization of viral forms observed in persistent hepatitis infections, chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in woodchucks and humans. In *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH eds) New York, Grune & Stratton: pp. 225-243
- Shaul Y, Rutter WJ & Laub O (1985): A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 4: 427-430
- Shaul Y, Ziemer M, Garcia PD, Crawford R, Hsu H, Valenzuela P & Rutter WJ (1984): Cloning and analysis of integrated hepatitis virus sequences from a human hepatoma cell line. *J. Virol.* 51: 776-787

Shaul Y, Ben-Levy R & De-Medina T (1986): High affinity binding site for nuclear factor I next to hepatitis B virus S gene promoter. *EMBO J.* 5: 1967-1971

Sherr CJ, Fedele LA, Oskarsson M, Maizel J & vande Woude G (1980): Molecular cloning of Snyder-Theilen feline leukemia and sarcoma viruses: Comparative studies of feline sarcoma virus with its natural helper virus and with Moloney murine sarcoma virus. *J. Virol.* 34: 200-212

Siddiqui A, Jameel S & Mapoles J (1987): Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2513-2517

Sodroski JG, Rosen CA & Haseltine WA (1984): Transacting transcriptional activation of the long terminal repeat (LTR) of human T lymphotropic virus in the infected cells. *Science* 225: 381-385

Sodrosky J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwillinger E & Haseltine W (1986): A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLVIII replication. *Nature* 321: 412-417

Southern E (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517

Standring DN, Rall LB, Laub O & Rutter WJ (1983): Hepatitis B virus encodes an RNA polymerase III transcript. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1774-1782

Stein R & Ziff EB (1984): HeLa cell beta-tubulin gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel

with viral early genes by an E1a-dependent mechanism. Mol. Cell. Biol. 4: 2792-2801

Stibbe W & Gerlich WH (1983): Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. J. Virol. 46: 626-628

Summers J, Smolec J & Snyder R (1978): A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatome in woodchucks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4533-4537

Summers J (1982): The recently described animal virus models for human hepatitis B virus. Hepatology 1: 179-183

Sureau C, Romet-Lemonne J-L, Mullins JI & Essex M (1986): Production of hepatitis B virus by a differentiated hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. Cell 47: 37-47

Szmunness W (1978): Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. Prog. Med. Virol. 24: 40-69

Takahashi N, Ueda S, Obata M, Nikaido T, Nakai S & Honjo T (1982): Structure of human Immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family. Cell 29: 671-679

Thung SN & Gerber MA (1983): Albumin binding sites on human hepatocytes. Liver 3: 290-295

Tiollais P, Charnay P & Vyas GN (1981): Biology of hepatitis B virus. Science 213: 406-411

Tiollais P, Pourcel C & Dejean A (1985): The hepatitis B virus. *Nature* 317: 489-496

Tognoni A, Cattaneo R, Serfling E & Schaffner W (1985): A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer. *Nucl. Acids Res.* 13: 7457-7472

Toh H, Hyashida H & Miyata T (1983): Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerase of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 305: 827-829

Tooze J (Hrsg.) (1980): *DNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Treinin M & Laub O (1987): Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol. Cell. Biology* 7(1): 545-548

Tsurimoto T, Fujiyama A & Matsubara K (1987): Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 444-448

Tur-Kaspa J, Burk RD, Shaul Y & Shafritz DA (1986): Hepatitis B virus contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1627-1631

Twist EM, Clark HF, Aden DP, Knowles BP & Plotkin SA (1981): Integration pattern of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatoma cell lines. *J. Virol.* 37: 239-243

- Twu JR & Schloemer RH (1987): Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.* 61: 3448-3453
- Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Gray P & Rutter WJ (1980): The nucleotide sequence of hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Fields BN, Jaenisch R & Fox CF (Hrsg.), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, New York, pp. 57-70
- Varmus HE (1984): The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.* 18: 553-612
- Wang Y, Schaefer-Ridder M, Stratowa C, Wong T-K & Hofschneider PH (1982): Expression of hepatitis B surface antigen in unselected cell culture transfected with re-circularized HBV DNA. *EMBO J.* 1: 1213-1216
- Wang JYJ & Baltimore D (1983): Cellular RNA homologous to the Abelson murine leukemia virus transforming gene: Expression and relationship to the viral sequence. *Mol. Cell. Biol.* 3: 773-779
- Will H, Cattaneo R, Gholamreza D, Deinhardt F, Schellekens H & Schaller H (1985): Infectious hepatitis B virus from cloned DNA of known nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 891-895
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, Cattaneo R & Schaller H (1987): Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* 61: 904-911
- Wogan GN (1976): Aflatoxins and their relationship to hepatocellular carcinoma. In *Hepatocellular Carcinoma*

(Okuda K, Peters RL eds) New York: J. Wiley & Sons: pp 25-42

Wollersheim M & Hofschneider PH (1987): Transactivation by a product of the X gene of hepatitis B virus. In Viral Hepatitis and Liver Disease, Ed. Alan R. Liss, Inc. (in press).

Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp8 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-109

Yoakum GH, Korba BE, Lechner JF, Tokiwa T, Gazdar AF, Seeley T, Siegel M, Leeman L, Autrup H & Harris CC (1983): High-frequency transfection and cytopathology of the hepatitis B virus core antigen gene in human cells. Science 222: 385-389

Yokosuka O, Omata M, Zhou Y-Z, Imazeki F & Okuda K (1985): Duck hepatitis B virus DNA in liver and serum of chinese ducks: integration of viral DNA in a hepatocellular carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5180-5184

Zahm P & Hofschneider PH (1987): Sixth Internatl. Symp. on Viral Hepatitis and Liver Disease, London (Abstr. No. 311)

H. ABKÜRZUNGEN

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CAT	Chloramphenicol-acetyltransferase
CIP	alkalische Phosphatase
cpm	Impulse pro Minute
dATP	2' - Desoxyadenosin - 5' - Triphosphat
dCTP	2' - Desoxycytosin - 5' - Triphosphat
dGTP	2' - Desoxyguanosin - 5' - Triphosphat
DNase	Desoxyribonuclease
dTTP	2' - Desoxythymidin - 5' - Triphosphat
E.coli	Escherichia coli
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
HBV	Hepatitis B Virus
IPTG	Isopropylthio- β -galaktosid
kb	kilobasenpaare
kD	kilo-Dalton
M	Molar
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
NC	Nitrocellulose
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PLC	Primäres Leberzellkarzinom
^{32}P	radioaktives Isotop von Phosphor
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
U	Enzymeinheit
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

I. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider danke ich für die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Horst Schmieger danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rajen Koshy und Herrn Dr. Peter Zahm für ihre Anteilnahme und stete Diskussionsbereitschaft.

Für die vielen, nützlichen Gespräche möchte ich mich bei Herrn Dr. Kurth Roth bedanken.

Für seine Hilfe beim Erlernen der DNA-Sequenzierungstechnik bin ich Herrn Dr. Matthias Hillmann verpflichtet.

Für die technische Hilfe in der Gewebekultur danke ich Frau I. Dick und Frl. S. Hankel.

J. LEBENS LAUF

- 4.2.1958 geboren in Freiburg/Brsg.
- 1965 - 1968 Grundschule in Freiburg
- 1968 - 1977 Wenzinger-Gymnasium in Freiburg,
Abitur
- 1977 - 1984 Studium der Chemie an der Albert-
Ludwigs-Universität, Freiburg
- Feb. 1980 Diplom-Vorprüfung
- Okt. 1983 Diplom-Hauptprüfung
- Nov. 1983 - Diplomarbeit: "Untersuchung zur intra-
zellulären Kristallbildung bei der
Vitalfärbung von Mäusefibroblasten mit
Thiopyronin" unter der Leitung von
Prof. Dr. Zimmermann (Institut für Phy-
sikalische Chemie, Albert-Ludwigs-Uni-
versität, Freiburg)
- ab Nov. 1984 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität, München
- Sept. 1984 - Dissertationsarbeit unter der Leitung
von Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider
(Abteilung Virusforschung, Max-Planck-
Institut für Biochemie, Martinsried)
- Dez. 1987

Der ätiologische Zusammenhang zwischen der persistierenden Hepatitis B Virus (HBV) Infektion und der Entstehung des primären Leberzellkarzinoms (PLC) beim Menschen gilt aufgrund epidemiologischer Untersuchungen als sehr wahrscheinlich. Die Rolle des HBV bei der Entwicklung des PLC war auf molekularer Ebene noch nicht geklärt.

Da in HBV-positiven primären hepatozellulären Karzinomen nur chromosomal integrierte, nicht aber frei replizierende, HBV DNA vorhanden ist, muß man, um die molekularen Mechanismen der HBV assoziierten Hepatokarzinogenese verstehen zu können, integrierte HBV DNA Sequenzen analysieren. Aus diesem Grunde erschien es zweckmäßig, eine Hepatom-Zelllinie mit nur einem HBV DNA Integrat detailliert zu untersuchen und erneut folgende Fragen zu beantworten:

- Welche Struktur und Funktion hat die integrierte HBV DNA?
- Welche Funktionen üben die zur HBV DNA Sequenz benachbarten, humanen DNA Sequenzen aus?
- Besitzen diese humanen Sequenzen im Zusammenwirken mit dem HBV DNA Integrat onkogene Eigenschaften?
- Kann man die erhaltenen Daten einem der klassischen Mechanismen der viralen Onkogenese zuordnen?

Jochen Duelli wurde am 4.2.1958 in Freiburg i.Br. geboren. Nach dem Abitur am Wenzinger-Gymnasium in Freiburg Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität, das er 1984 mit dem Diplom abschloß. 1988 Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

ISBN 3-925632-03-4